

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-
Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. T. Ruzicka

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von

Anne-Marie Schmidt-Habel
aus Düsseldorf
2013

**Erkennung von Candida albicans in Keratinozyten:
Vergleich muriner und humaner Keratinozyten hinsichtlich der Bedeutung des
Transkriptionsfaktors
NF- κ B und der Toll-like-Rezeptoren 2 und 4**

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Rudolf A. Rupec
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Rainer Haas
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. Bernd Rebholz
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	21.02.2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Das Immunsystem	3
1.1.1 Erworbene Immunantwort	3
1.1.2 Angeborene Immunantwort.....	5
1.2 Toll-like-Rezeptoren	7
1.3 NF- κ B.....	9
1.4 <i>Candida albicans</i>	12
1.4.1 Allgemeines.....	12
1.4.2 Pathogenität, Virulenzfaktoren, Zellwand.....	13
1.4.3 Klinische Bedeutung.....	15
1.4.4 Erkennung von <i>C. albicans</i> durch das Immunsystem	16
1.5 Keratinozyten: Vorkommen, Differenzierung, Immunität und TLR	17
1.6 Zielsetzung.....	19
2 Material und Methoden	21
2.1 Chemikalien, Reagenzien und Medien	21
2.2 Antikörper.....	26
2.3 siRNS	26
2.4 HaCaT-Zellen.....	27
2.5 Mäuse	27
2.6 <i>Candida albicans</i>	27
2.7 Geräte/Materialien.....	27
2.8 Methoden	29
2.8.1 <i>C. albicans</i> -Synchronisierung.....	29
2.8.2 Extraktion von Keratinozyten aus Mäusen	29
2.8.3 Kultivierung der HaCaT-Zellen	30
2.8.4 siRNS-Transfektion	31
2.8.5 Stimulation.....	31
2.8.5.1 HaCaT-Zellen	31
2.8.5.2 Murine Keratinozyten.....	31
2.8.6 Proteinisolierung und Messung.....	32
2.8.6.1 Proteinisolierung aus murinen Keratinozyten	32

2.8.6.2	Proteinmessung:	32
2.8.7	RNS-Isolierung und Messung aus HaCaT-Zellen	33
2.8.7.1	RNS-Messung	34
2.8.8	EMSA	34
2.8.9	Westernblot	35
2.8.10	Real-Time PCR (RT-PCR)	37
3	Ergebnisse	41
3.1	Murine Keratinozyten	41
3.1.1	Aktivierung von p65 in murinen Wildtypkeratinozyten nach Stimulation mit <i>C. albicans</i>	42
3.1.2	TLR2 und TLR4 abhängige Aktivierung von p65 nach Stimulation mit <i>C. albicans</i> (EMSA Analysen)	43
3.1.3	Phosphorylierung von p65 nach Stimulation mit <i>C. albicans</i>	45
3.2	HaCaT (humane Keratinozyten)	47
3.2.1	Hemmung von TLR2 und TLR4	48
3.2.2	TLR2 und TLR4 abhängige Expression von IL-1 β und IL-8 nach Stimulation mit <i>C. albicans</i>	50
3.2.3	Expression von IL-1 β und IL-8 in humanen Keratinozyten nach Hemmung von p65	52
3.3	Statistische Auswertung und benutzte Software	55
4	Diskussion	56
4.1	Rolle von TLR2 und TLR4 in der Erkennung von <i>C. albicans</i> in murinen Keratinozyten auf Proteinebene	57
4.2	Rolle von TLR2 und TLR4 vermittelter NF- κ B Aktivierung in der Erkennung von <i>C. albicans</i> in humanen Keratinozyten auf mRNS Ebene:	59
4.3	Rolle der NF- κ B Untereinheit p65 in der Zytokinproduktion auf mRNS Ebene von humanen Keratinozyten nach Stimulation mit <i>C. albicans</i>	60
5	Zusammenfassung	62
6	Abkürzungen	63
7	Danksagung	66
8	Lebenslauf	67
	Literaturverzeichnis	69

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem schützt uns sowohl vor pathogenen exogenen Keimen als auch vor potentiell bösartigen körpereigenen Zellen (Tumorentstehung). Ebenso schützt uns das Immunsystem vor Mechanismen, die Autoimmunerkrankungen entstehen lassen. Um gute Arbeit zu leisten, müssen die Abwehrzellen in der Lage sein, zwischen körpereigenen und körperfremden Antigenen zu unterscheiden. Für die Erkennung von körperfremden Antigenen, welche eine Immunreaktion auslösen können, dienen Rezeptoren auf der Oberfläche der Abwehrzelle. Diese können eine entsprechende Immunantwort auslösen.

Man unterscheidet zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem. Beide wirken sowohl über humorale als auch zelluläre Mechanismen. Der Unterschied zwischen beiden liegt unter anderem darin, dass das angeborene Immunsystem Antigene erkennt, die vielen Krankheitserregern gemein sind, wohingegen das erworbene Immunsystem spezifische Antigene erkennt. Beide Immunsysteme arbeiten aber nicht getrennt voneinander, sondern sind eng miteinander verknüpft. Das eine kann ohne das andere nicht bestehen (Alberts, Johnson et al. 2003; Neumann 2008).

1.1.1 Erworbene Immunantwort

Das erworbene oder adaptive Immunsystem schützt den Menschen vor Infektionen durch gefährliche Krankheitserreger, auch Pathogene genannt. Im Gegensatz zur angeborenen Immunantwort sind die Immunantworten des adaptiven Immunsystems hoch spezifisch für die jeweiligen auslösenden Pathogene (Alberts, Johnson et al. 2003; Andersen, Schrama et al. 2006).

Effektorzellen der adaptiven Immunantwort sind die Lymphozyten, eine Untergruppe der weißen Blutzellen. Man unterscheidet zwei Klassen von Immunantworten: Zum einen die antikörpervermittelte, zum anderen die zellvermittelte. Für die jeweilige Immunantwort sind verschiedene Klassen der Lymphozyten verantwortlich. Die Antikörper Immunantwort wird durch B- Lymphozyten, die zellvermittelte durch die T-Lymphozyten aktiviert (Bonilla and Oettgen 2010).

Antikörper werden von B-Lymphozyten produziert und zirkulieren im Blut und in anderen Körperflüssigkeiten, zum Beispiel Tränen und Muttermilch. Wird einem naiven B-Lymphozyt ein Antigen präsentiert, bildet er spezifische Antikörper gegen dieses Antigen. Antigene sind Substanzen, die eine Immunantwort ausbilden können. Die Antikörper binden an die spezifischen Antigene, durch die sie induziert wurden. Durch diese Bindung inaktivieren sie die Antigene, da diese nun nicht mehr an den verschiedenen Körperzellen binden können. Des weiteren wird durch die Bindung die Phagozytose der Antigene durch Makrophagen erleichtert (Carroll 2008).

Im Gegensatz dazu reagieren bei der zellvermittelten Immunantwort aktivierte T-Lymphozyten direkt gegen ein fremdes Antigen. Initial wird die pathogene Zelle von Antigen-Präsentierenden Zellen (APZ) phagozytiert und auf ihrer Oberfläche präsentiert. Danach wandern diese in die regionalen Lymphknoten, wo sie die Antigene naiven T-Lymphozyten präsentieren und aktivieren. Die aktivierten T-Lymphozyten wandern in die Gewebe zurück. Beim nächsten Kontakt mit dem spezifischen Antigen kommt es entweder zur direkten Zerstörung der Zielzelle oder zur Stimulation anderer Immunzellen wie Makrophagen, welche die Zerstörung übernehmen. Hierbei spielen zwei Klassen von T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle. Zum einen die zytotoxischen T-Lymphozyten, zum anderen die T-Helfer-Lymphozyten.

Die zytotoxischen T-Lymphozyten zerstören die Zielzelle direkt durch Induktion von Apoptose. Die T-Helfer-Lymphozyten aktivieren zusätzliche Immunzellen wie Makrophagen und zytotoxische T-Lymphozyten zur Unterstützung (Dudley 1992; Alam 1998; Andersen, Schrama et al. 2006).

Eine grundlegende Fähigkeit dieses Systems muss es sein, fremd von eigen zu unterscheiden, damit sich das Immunsystem nicht gegen sich selbst richtet. Gelegentlich kommt es zu Verwechselungen und Ausbildung von Autoimmunkrankheiten (Jiang and Chess 2009).

1.1.2 Angeborene Immunantwort

Der Mensch ist jeden Tag dem Angriff potenzieller Krankheitserreger ausgesetzt. Ein effektiver Weg, diese Krankheitserreger abzuwehren ist durch das angeborene Immunsystem gegeben. Anders als das adaptive, dessen Antwort zwar spezifisch ist aber dessen Aktivierung langsamer von statten geht, kann das angeborene Immunsystem schnell auf Eindringlinge reagieren (Alberts, Johnson et al. 2003).

Die erste Barriere, die ein Pathogen überwinden muss, ist das Epithel. Die Haut und die Epithelien im Körperinneren bilden eine effektive physikalische Barriere. Die Barrierefunktion wird noch unterstützt durch einen Schleimfilm, der viele Epithelien überzieht und das Anhaften von Pathogenen verhindert. In den Atemwegen sorgt zusätzlich der Zilienschlag für den Abtransport. Die Schleimschicht besteht aber nicht nur aus Mucinen, sondern enthält auch antimikrobielle Substanzen, die Defensine. Defensine sind meist kurze Proteine (12-50 Aminosäuren) und haben ein breites Spektrum an antimikrobieller Aktivität, zum Beispiel können sie Toxine neutralisieren, wirken immundulatorisch, regen die Gefäßneubildung und Wundheilung an (Schneider, Unholzer et al. 2005; Niyonsaba, Nagaoka et al. 2006; Carroll 2008; Guani-Guerra, Santos-Mendoza et al. 2010).

Durchbricht ein Pathogen die Barriere muss es möglichst schnell erkannt und eliminiert werden. Die Zellen des Immunsystems erkennen so genannte pathogenassoziierte Immunstimulanzen (Pathogen associated microbial patterns, PAMP). Pathogenassoziierte Immunstimulanzen sind zum Beispiel kurze Bakterien- DNS Sequenzen. Beispielsweise die Peptidoglykan-Zellwand von Bakterien, Lipopolysaccharide (LPS) als Bestandteil von Bakteriengeißeln oder Moleküle aus den Zellwänden von Pilzen, wie Zymosan, Glucan und Chitin. Diese PAMP werden von verschiedenen Rezeptoren, Mustererkennungsrezeptoren, der Wirtszellen erkannt. Diese Rezeptoren sind einmal an Oberflächen von verschiedenen Zellen gebunden zum anderen zirkulieren sie als lösliche Rezeptoren im Blut (Kawai and Akira 2009).

Als lösliche Rezeptoren im Blut dienen Komponenten des Komplementsystems. Die verschiedenen Komponenten des Komplementsystems arbeiten zusammen, um die Membran von Mikroorganismen zu zerstören, oder um die Pathogene zu markieren für

die Phagozytose durch neutrophile Granulozyten, Monozyten oder Makrophagen (Morgan, Marchbank et al. 2005; Rus, Cudrici et al. 2005).

Zu den membrangebundenen Oberflächenrezeptoren gehört die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLR). Die Oberflächenrezeptoren dienen hauptsächlich dazu, in der Wirtszelle die Genexpression zu regulieren, um weitere Immunzellen zu stimulieren. Sie leiten jedoch auch die Phagozytose des Pathogens ein. Menschen besitzen mindestens zehn verschiedene TLR. Die unterschiedlichen TLR reagieren auf verschiedene PAMP. Viele von ihnen verwenden den NF- κ B Signalweg zur Transkription von Genen, die an Immun- und Entzündungsprozessen beteiligt sind (Kumar, Kawai et al. 2009).

Zu den phagozytierenden Zellen gehören - wie schon erwähnt - die Makrophagen, die sich in allen Körpergeweben befinden, ihre im Blut zirkulierenden Vorläufer die Monozyten und die neutrophilen Granulozyten. Um die Pathogene zu erkennen, besitzen diese Zellen an ihrer Oberfläche Mustererkennungsrezeptoren, die PAMP erkennen. Bindet ein Ligand an einen Rezeptor stülpt der Phagozyt seine Plasmamembran über den Erreger und nimmt ihn in ein membranbegrenztes Phagosom auf. Innerhalb des Phagosoms werden die Pathogene durch eine Kombination aus abbauenden Enzymen, antimikrobiellen Peptiden und reaktiven Sauerstoffverbindungen abgetötet (Flannagan, Cosio et al. 2009).

Dringt ein Pathogen in den Körper ein, reagiert dieser fast immer mit einer Entzündung. Klinische Zeichen hierfür sind Rötung (Rubor), Schwellung (Induration), Schmerz (Dolor) und Überwärmung (Calor) im Infektionsgebiet. Diese Reaktionen werden durch Veränderungen in den lokalen Blutgefäßen ausgelöst. Es kommt zur Dilatation der Gefäße, wodurch diese durchlässig werden für Flüssigkeiten und Proteine. Dadurch kommt es zur Schwellung des umliegenden Gewebes und zur Ansammlung von Zellen, die zur Immunverteidigung dienen. Die Endothelzellen werden zur Expression von Oberflächenproteinen stimuliert, die weiße Blutkörperchen zum Infektionsherd locken. Die Entzündungsreaktion wird von einer Vielzahl von Signalmolekülen ausgelöst und unterhalten. Über die Aktivierung von TLR kommt es zur Synthese von Signalstoffen, wie Prostaglandinen und Zytokinen. Diese Signalstoffe bewirken, dass noch mehr Abwehrzellen angelockt werden und dass das adaptive Immunsystem aktiviert wird.

Das adaptive und das angeborene Immunsystem arbeiten also nicht getrennt voneinander, sondern Hand in Hand.

1.2 Toll-like-Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren (TLR) zeigen große Ähnlichkeit zu dem Toll-Rezeptor, der in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* identifiziert wurde. Initial wurde er als Protein identifiziert, dass bei der dorsoventralen Polarität in Fliegenembryonen eine Rolle spielt. Später zeigte sich, dass er auch eine Rolle in der Immunantwort spielt, insbesondere bei der Resistenz gegen Pilzinfektionen (Leulier and Lemaitre 2008). Wird eine Fliege durch einen pathogenen Pilz infiziert, führt dies dazu, dass die Toll-Signaltransduktionskaskade in Gang gesetzt wird und der Transkriptionsfaktor NF- κ B in den Zellkern gelangt. Hier aktiviert er die Transkription verschiedener Gene, die in der Abwehr gegen Pilzinfektionen wichtig sind (Hetru and Hoffmann 2009).

TLR gehören zu den pattern-recognition-receptors (PRR), Mustererkennungsrezeptoren, die pathogen-associated microbial patterns (PAMP) (Netea, Ferwerda et al.) erkennen können. Diese PAMP sind zum Beispiel Lipopolysaccharide, Zymosan, Peptidoglykane, Bakteriengeweise, Desoxyribonukleinsäure (DNS) und Ribonukleinsäure (RNS) von Bakterien und Viren (Aderem and Ulevitch 2000; Kumar, Kawai et al. 2009).

Strukturell sind die TLR Transmembranrezeptoren, die aus einer extrazellulären Leucinreichen Domäne (LRR) und einer intrazellulären TIR Domäne (Toll/IL-1-Rezeptor) bestehen. Die TIR Domäne weist große Ähnlichkeiten mit dem IL-1-Rezeptor auf.

Bindet nun ein Ligand an einen Rezeptor, wird eine Signaltransduktionskaskade in Gang gesetzt. Diese führt über Protein-Protein Interaktionen, Phosphorylierungen und Konformationsänderungen zur Transkription der Zielgene (Akira 2006).

Hat ein entsprechendes PAMP (z. B. LPS) an einen TLR gebunden, bindet auf der zytosolischen Seite das Adapterprotein Myeloid differentiation marker 88 (MyD88) an die Transmembrandomäne des TLR. Durch MyD88 in Zusammenarbeit mit Toll-interacting-protein (TOLLIP) wird die Serin-Threonin-Proteinkinase Interleukin-1-receptor-associated Kinase (IRAK) mit dem Rezeptorkomplex verbunden und autophosphoryliert. Zudem bindet ein weiteres Adaptermolekül (Tumor necrosis factor receptor associated factor 6, TRAF6) an den Rezeptorkomplex (O'Neill, Dunne et al. 2003).

An diesem Punkt teilt sich der Signaltransduktionsweg. TRAF6 bindet und aktiviert zwei verschiedene Kinasen: Transforming growth factor β -activated kinase (TAK1) und Mitogen activated protein kinase/ectracellular signal-regulated kinase kinase (MEKK1). TAK1 führt über Phosphorylierung der I κ B-Kinase (IKK) zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor κ B (NF- κ B), während MEKK1 zur Aktivierung des Transkriptionsfaktor Activating protein-1 (AP-1) führt. Beide führen letztlich dazu, dass Zielgene transkribiert werden (Abbildung 1) (Aderem and Ulevitch 2000; Kirschning and Bauer 2001; Iwasaki and Medzhitov 2004; Kawai and Akira 2007; Brikos and O'Neill 2008).

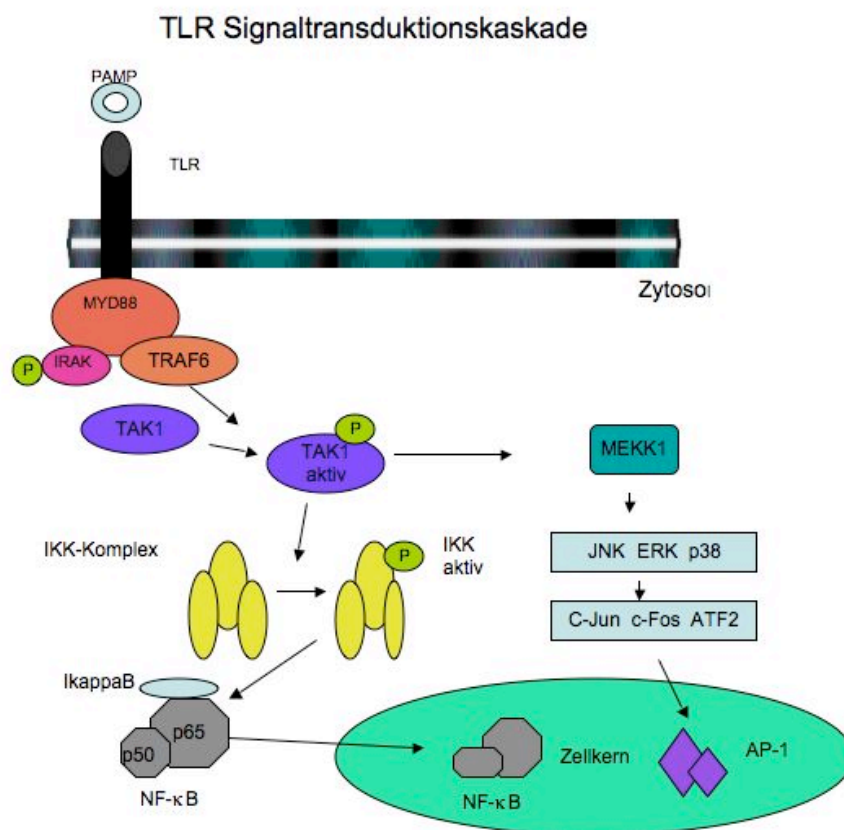


Abbildung 1

Aktivierung von NF- κ B und AP-1 über den TLR Signaltransduktionsweg

Über die Aktivierungen von verschiedenen Kinasen kommt es auf der einen Seite zur Aktivierung des IKK-Komplexes und damit zur Degradation von I κ B. Danach gelangt der Heterodimer-Komplex aus p65 und p50 in den Zellkern und führt zur Ablesung verschiedener Gene. Auf der anderen Seite wird AP-1 durch verschiedene MAP Kinasen wie JNK, ERK und p38 aktiviert.

Es wurden bis heute 11 TLR identifiziert. Die meisten befinden sich an der Zelloberfläche, es gibt sie jedoch auch intrazellulär (Tab.1).

Name	Lokalisation	Funktion
TLR1,2 und 6	Zelloberfläche	TLR2 bindet eine Reihe von mikrobiellen Lipoproteinen und Lipopeptiden. TLR2 bildet funktionelle Heterodimere mit TLR1 und TLR6. Diese Komplexe binden entweder diacylierte oder triacylierte Lipopeptide.
TLR3	Endosom	TLR3 besitzt eine Funktion bei der Antwort gegen dsDNS (ds = doppelsträngig), die während der Replikation von Viren in einer Zelle gebildet wird. Vermutlich bindet dieser Rezeptor dsRNS Fragmente und trägt dadurch zu einer antiviralen Antwort bei.
TLR4	Zelloberfläche	TLR4 liegt assoziiert mit dem LPS-Rezeptor vor. Nach Bindung von LPS an den Rezeptor wird ein Signal in die Zelle geleitet, das zur Transkription von antibakteriellen Molekülen und Signalmolekülen führt.
TLR5	Zelloberfläche	TLR5 bindet an Flagellin, den Hauptbestandteil von bakteriellen Flagellen.
TLR7,8	Endosom	Beide Rezeptoren binden an guanosin- oder uracilreiche virale ssRNS (einzelssträngige DNA), wie sie bei RNS Viren (z. B. Influenza Virus) vorkommen. Wirtseigene ssRNS kommt nicht in Endosomen vor.
TLR9	Endosom	Rezeptor für doppelsträngige bakterielle DNS (dsDNS). Die Bindung von TLR9 führt u.a. zur Synthese von antimikrobiellen, entzündungsfördernden (inflammatorischen) Zytokinen.

Tabelle 1

Überblick Toll-like-Rezeptoren (TLR) (Hallman, Ramet et al. 2001; Janeway and Medzhitov 2002; O'Neill and Bowie 2007; Bauer, Muller et al. 2009)

1.3 NF- κ B

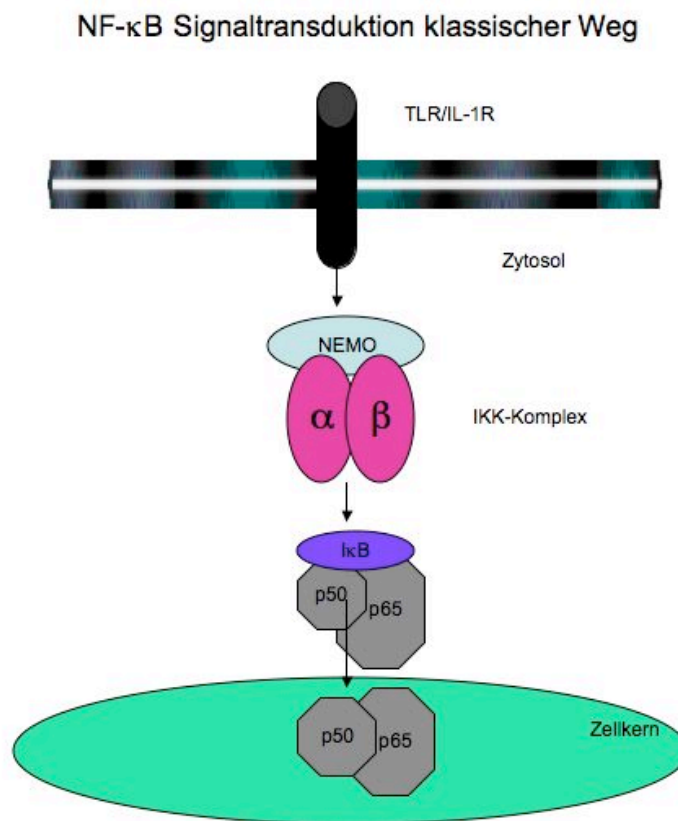
NF- κ B wurde 1986 das erste Mal beschrieben. Man nahm an, er sei ein B-Lymphozyten spezifischer Transkriptionsfaktor, der an die leichte Kette des Immunglobulin κ -Enhancers bindet (Sen and Baltimore 1986). Bald wurde aber erkannt, dass er nicht nur in Zellen des Immunsystems vorkommt, sondern ubiquitär exprimiert wird, zum Beispiel auch in Keratinozyten, Neuronen und anderen. Aktiviert wird er durch verschiedenste Stimuli, zum Beispiel physikalischen Stress, infektiöse Antigene, zelluläre Botenstoffe und oxidativen Stress (Pahl 1999; Sethi, Sung et al. 2008).

Eine Reihe von Genen wird von NF- κ B kontrolliert, dazu gehören Zytokine (Interleukine wie z. B. IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18), Wachstumsfaktoren, Stressproteine bis hin zu Immunmodulierenden Mechanismen wie Major histocompatibility complex (MHC) Molekülen (Pahl 1999). Somit spielt NF- κ B eine entscheidende Rolle in der Immunantwort (Liou 2002; Wong and Tergaonkar 2009). NF- κ B gehört zur Familie der Rel-Proteine, bestehend aus RelA (p65), Rel-B, c-Rel, NF- κ B1 (p50) und NF- κ B2 (p52). Am häufigsten liegt NF- κ B als Heterodimer bestehend aus p65/p50 vor.

Im inaktiven Zustand liegt NF- κ B an seinen Inhibitor I κ B gebunden im Cytosol vor (Bakkar and Guttridge 2010). Dieser Inhibitor maskiert das Kernlokalisierungssignal und verhindert so, dass NF- κ B in den Zellkern gelangt, um dort seine Zielgene zu aktivieren. Mittlerweile konnten sieben I κ B-Moleküle identifiziert werden (I κ B- α , I κ B- β , I κ B- γ , I κ B- ϵ , Bcl-3, p100 und p105)(Liou 2006).

Wie bereits beschrieben, können TLR eine Signaltransduktionskaskade in Gang setzen, die zur Aktivierung von NF- κ B führt. Dabei kommt es zur Phosphorylierung der I κ B - Moleküle durch den I κ B-Kinase-Komplex (IKK-Komplex) und damit zur Demaskierung des Kernlokalisierungssignals. Dieser IKK-Komplex besteht aus den zwei Kinasen IKK α und IKK β sowie der regulatorischen Untereinheit NF- κ B essential modulator/IKK γ (NEMO). NF- κ B kann nun in den Zellkern gelangen und dort seine Zielgene aktivieren (Ghosh and Hayden 2008; Rebholz, Kehe et al. 2008; O'Dea and Hoffmann 2009).

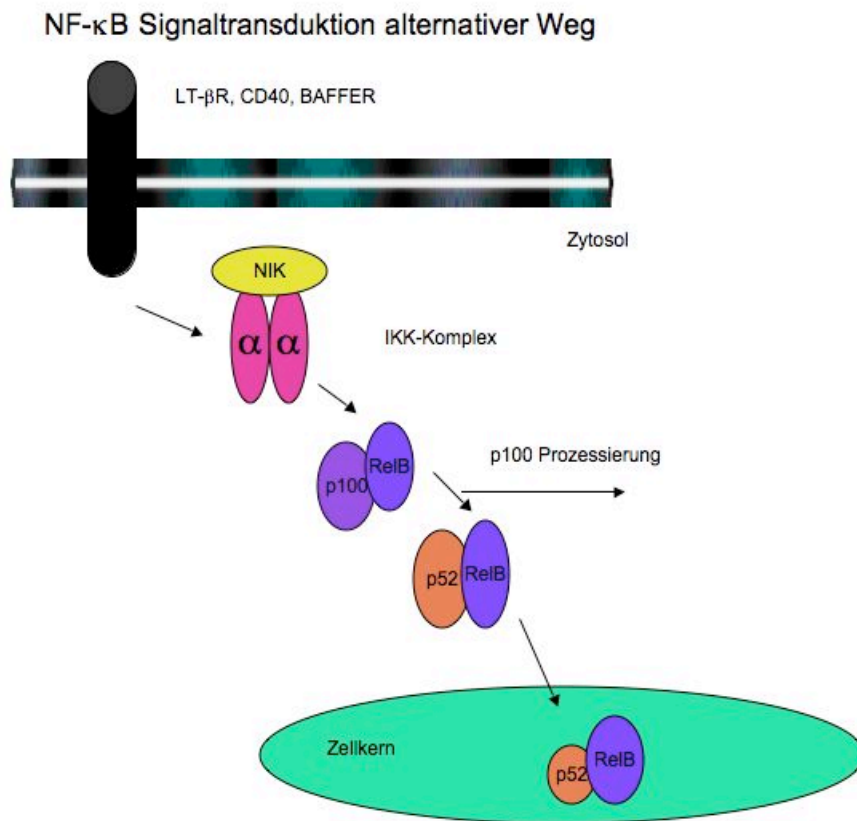
Die Aktivierung über den IKK-Komplex ist charakteristisch für den so genannten „klassischen Weg“ (Abbildung 2). Der klassische Weg wird vor allem über die TNF-Rezeptoren 1 und 2 und die Toll-like Rezeptoren vermittelt.

**Abbildung 2****Aktivierung von NF- κ B über den klassischen Weg**

Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt über die Degradation von I κ B durch den IKK-Komplex.

Neben diesem klassischen Weg gibt es auch den alternativen Weg (Abbildung 3). In diesem alternativen Signalweg kommt es zur Phosphorylierung und Prozessierung von p100 zu p52. Dies wird von einer durch eine NF- κ B-Inducing-Kinase (NIK) aktivierte IKK β -Untereinheit vermittelt. Das aktivierte p52 verbindet sich mit der RelB-Untereinheit und gelangt so als Heterodimer in den Zellkern.

Der alternative Weg wird hauptsächlich von verschiedenen Mitgliedern der TNF-Rezeptoren, beispielsweise Lymphotoxin β - (LT β), BAFF- oder CD40-Rezeptoren, benutzt (Dejardin 2006; Bakkar and Guttridge 2010).

**Abbildung 3****Aktivierung von NF- κ B auf dem alternativen Weg**

Die von NIK aktivierte IKK α Untereinheit sorgt für die Prozessierung von p100 zu p52. Danach kann der Heterodimer aus p52 und RelB in den Zellkern gelangen.

1.4 Candida albicans**1.4.1 Allgemeines**

C. albicans ist ein humanpathogener Pilz der Gattung *Candida*. Er besitzt 2 mal 8 Chromosomen (diploider Chromosomensatz), die in ihrer Größe zwischen 1030 bis 3200 kb variieren. Das Genom ist sehr dynamisch, es unterliegt vielen Strangbrüchen, Translokationen und Mutationen, so dass es unter den verschiedenen Stämmen keine zwei gleichen Karyotypen gibt (Kabir and Hussain 2009). Bisher nahm man an, dass sich *Candida* asexuell vermehrt. Neuere Forschungsergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass *C. albicans* sich unter bestimmten Bedingungen sexueller Mechanismen für den Austausch genetischen Materials zwischen verschiedenen Isolaten bedient, und

dass diese Fähigkeit eine Rolle in der Anpassung des Pilzes an bestimmte Stressbedingungen spielt (Nielsen and Heitman 2007; Hertz-Fowler and Pain 2009). Die einzelne Pilzzelle ist rundlich-oval und 4-10 μ m groß. Morphologisch können so genannte Pseudohyphen (hintereinander liegende Einzellzellen) von echten Hyphen (fadenförmige Zellen) und Blastokonodien (elongierte Sprosszellen) unterschieden werden. Desweiteren ist *C. albicans* in der Lage so genannte Chlamydosporen auszubilden. Diese Chlamydosporen (Dauersporen) sind größer als Blastokonodien und besitzen eine äußerst widerstandsfähige Zellwand. Kultiviert man *C. albicans*, so entstehen weiße, cremige Kolonien mit hefeartigem Geruch.

1.4.2 Pathogenität, Virulenzfaktoren, Zellwand

C. albicans gehört zur Normalflora eines gesunden Menschen. Man findet ihn sowohl in Abstrichen von Nasen-Rachenraum, Vagina, Haut und im Magendarmtrakt der meisten Menschen (Garber 2001; Homann, Dea et al. 2009). Er ist ein fakultativ pathogener Keim, kann also unter bestimmten Vorraussetzungen zu einem Problem für den Wirt werden. Beispielsweise bei einer Schwächung des Immunsystems, einem Verlust an phagozytierenden Zellen oder bei T-Zelldefekten kann das labile Gleichgewicht zugunsten von *C. albicans* kippen. Aber *C. albicans* ist kein passiver Keim, er hat verschiedene Virulenzfaktoren entwickelt, die es ihm ermöglichen, in die Wirtszelle einzudringen und den Organismus zu schädigen (Calderone 1993).

Die Virulenz und Pathogenität von *C. albicans* ist durch eine Vielzahl von Mechanismen und Anpassungsreaktionen bedingt (Calderone, Suzuki et al. 2000).

Zu den identifizierten Virulenzfaktoren gehören einerseits der Dimorphismus, die Fähigkeit sowohl in der Hefeform als auch in der Myzelform wachsen zu können, Adhäsionsfaktoren und das phänotypische Switching, die Fähigkeit Zelloberflächeneigenschaften und Antigenstrukturen reversibel zu verändern, was zu unterschiedlichen Koloniemorphologien führt. Andererseits zählen hierzu die Sekretion hydrolytischer Enzyme wie Lipasen und Phospholipasen und Proteinasen, die besonders während den ersten Stadien der Infektion eine Rolle spielen (Schaller, Borelli et al. 2005).

Man kann verschiedene Stadien unterscheiden, in denen die Virulenzfaktoren angreifen (Calderone and Fonzi 2001; Naglik, Challacombe et al. 2003):

Im *ersten Stadium* kommt es zur Kolonisation und Adhäsion an die Wirtszelle. Dies geschieht mittels Adhäsinen, hydrolytischen Enzymen und Hyphenbildung.

Im *zweiten Stadium* kommt es durch die hydrolytischen Enzyme zur Penetration des Epithels und zur oberflächlichen Infektion.

Im *dritten Stadium* kommt es zu tiefen Infektionen von Gewebe und der Keim gelangt in die Blutbahn. Dies geschieht wiederum durch hydrolytische Enzyme.

Im *vierten Stadium* kommt es durch Adhäsine, Hyphenbildung, phänotypisches Switching und durch die Enzyme zur Adhäsion am Gefäßendothel, Aktivierung der Gerinnung und Befall von tiefen Geweben und Organen zur disseminierten Infektion (Naglik, Albrecht et al. 2004). Bei den hydrolytischen Enzymen spielt insbesondere die sekretorischen Aspartat-Proteasen (SAP) aufgrund ihrer proteolytischen Eigenschaften nicht nur bei der Infektion eine große Rolle, sondern auch bei der Degradation von Proteinen zur Nährstoffbereitstellung und bei der Elimination von Immunglobulinen und Komplementfaktoren (Kaminishi, Miyaguchi et al. 1995). Auch vermutet man, dass die Menge an aktivierter SAP mit der Virulenz von *C. albicans* korreliert. Mittlerweile sind 10 unterschiedliche SAP Gene identifiziert worden. (Naglik, Albrecht et al. 2004). In-vitro-Studien weisen darauf hin, dass die SAP-Gene 1-3 für die Adhärenz und oberflächliche Infektionen zuständig sind, wären die SAP-Gene 4-6 und auch 2 für die disseminierten systemischen Infektionen verantwortlich sind (Monod and Borg-von 2002). Die Expression der einzelnen Faktoren ist variabel und abhängig von der Erregerlokalisation, Infektionsphase und Immunstatus.

Der menschliche Körper ist nicht ohne Schutz gegen *C. albicans* Infektionen. Es gibt eine Reihe von Mechanismen, die zur Abwehr von Pilzinfektionen bereit stehen. Hierzu gehören die zelluläre Abwehr in Form von Phagozytose durch zum Beispiel neutrophile Granulozyten, Serumfaktoren wie α 1-Antitrysin und α 2-Makroglobulin, und die Bildung von proteasespezifischen IgG Antikörpern (Ruchel, Boning-Stutzer et al. 1988).

Die Zellwand von Pilzen spielt in der Erkennung durch das Immunsystem eine zentrale Rolle. Sie besteht hauptsächlich aus drei Komponenten. Mit 80-90% machen die Kohlenhydrate den Hauptanteil (Glukan, Mannan, Chitin) der Zellwand aus. Der Proteinanteil beträgt 6-25%, hauptsächlich Mannoproteine. Des Weiteren sind die Fette wie Gly-

kolipide mit ca. 1-7% vertreten. Insgesamt ist die Zellwand 250-260nm dick (Chaffin 2008).

1.4.3 Klinische Bedeutung

Infektionen der Haut und Schleimhäute durch *C. albicans* findet man sowohl bei immunkompetenten als auch bei immunsupprimierten Menschen. Zu systemischen Infektionen kommt es in der Regel aber nur bei Menschen, deren Immunsystem schwer beeinträchtigt ist. *C. albicans* ist der Pilz, der am häufigsten nosokomiale Infektionen verursacht.

Das Spektrum an Infektionen, die durch *C. albicans* ausgelöst werden ist groß. Es reicht von oberflächlichen Haut- und Schleimhautinfektionen, Organinfektionen bis hin zur Sepsis (Ruhnke 2006; Blanco and Garcia 2008).

Verschiedene Faktoren spielen bei der Infektion mit *C. albicans* eine Rolle. Die oberflächlichen Infektionen betreffen die Haut, hier besonders die intertriginösen Bereiche, Schleimhäute, Nägel und Haare. Fast jede Frau leidet wenigstens einmal in ihrem Leben an einer vaginalen *C. albicans* Infektion (Kabir and Hussain 2009).

Oberflächliche Candidosen der Haut entwickeln sich bevorzugt in Arealen mit mechanischer Belastung (submammär, interdigital, im Windelbereich) und hoher Feuchtigkeit. Symptome einer intertriginösen Candidose können sein Juckreiz, Hautrötung und nässende Erosionen. Im Vulvovaginalbereich äußert sich eine Infektion ebenfalls mit starkem Juckreiz und weißlichem Flour. Beim Mann kommt es zur Candida-Balanitis mit Rötung von Eichel und Vorhaut. Mundsoor und Soorösophagitis erkennt man an weißlichen, leicht abstreifbaren, schmierigen Belägen. Die Soorösophagitis kann begleitet werden von Dysphagie und retrosternalen Schmerzen. Prädisponierend für die Entwicklung oberflächlicher Candidainfektionen sind zum einen Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus, zum anderen Schwangerschaften, Immunsuppression und im Allgemeinen Störungen der Schleimhautbarriere (Fridkin and Jarvis 1996).

Für immunkompetenten Menschen sind diese Infektionen zwar unangenehm, jedoch nicht lebensbedrohlich.

Besteht eine Immunsuppression (Tumorerkrankung oder Chemotherapie), kann es zur systemischen, disseminierten Candidose kommen. Im schlimmsten Fall kann es zu ei-

ner Sepsis mit Absiedelungen in verschiedene Organsysteme, beispielsweise zu einer Meningitis, Enzephalitis, Endokarditis oder Nephritis kommen (Darai, Handermann et al. 2009).

Eintrittspforte für den Pilz stellt nicht selten iatrogen eingebrachtes Material, beispielsweise Venenkatheter, dar (Kojic and Darouiche 2004; Pfaller and Diekema 2007).

Aber nicht nur *C. albicans* verursacht Infektionen, auch andere *Candida* Stämme, zum Beispiel *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* oder *dubliniensis*, spielen immer häufiger eine Rolle. Diese non-*C. albicans* Stämme treten vermehrt bei Patienten auf, die bereits mit Azolen antimykotisch vorbehandelt wurden.

1.4.4 Erkennung von *C. albicans* durch das Immunsystem

C. albicans wird von verschiedenen Rezeptorsystemen erkannt. Diese Rezeptoren vermitteln dann die weitere Immunantwort.

Zum einen sind dies die TLR. Die am besten untersuchten TLR sind TLR2 und 4.

TLR2 und 4 spielen in der Erkennung von *C. albicans* eine zentrale Rolle. Erkannt werden von den Rezeptoren Zellwandbestandteile wie β -Glukan und Mannan (Netea, Van der Graaf et al. 2004; Netea, Ferwerda et al. 2006). TLR9 dagegen erkennt Pilz DNS (Willment and Brown 2008). Weitere Rezeptorsysteme, die neben den TLR und auch in Zusammenarbeit mit ihnen bei der Erkennung von *C. albicans* eine Rolle spielen, sind der Mannose-Rezeptor und der Lektin-Rezeptor Dectin-1.

Der Mannose-Rezeptor, ein Transmembranrezeptor, reguliert zusammen mit TLR2 und 4 die Immunabwehr gegenüber *C. albicans*. Wie der Name bereits impliziert, erkennt er Mannanbestandteile der Zellmembran (Dobozy, Szolnoky et al. 1996; Szolnoky, Bata-Csorgo et al. 2001). Der Dectin-1 Rezeptor erkennt β -Glukan, ein Bestandteil der Zellwand von Pilzen. Wie die Erkennung von β -Glukan durch den Dectin-1 Rezeptor vor sich geht, ist noch nicht genau geklärt. Bei beiden Rezeptoren kommt es über verschiedene Adapterproteine und Kinasen, an deren Ende unter anderem Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B stehen, zur vermehrten Zytokinproduktion (Brown, Herre et al. 2003; Gantner, Simmons et al. 2003; Adachi and Ohno 2006; Kimberg and Brown 2008; Schorey and Lawrence 2008; Tsoni and Brown 2008; Goodridge, Wolf et al. 2009).

Durch die gleichzeitige Aktivierung mehrerer Rezeptoren kann ein Pathogen effektiver bekämpft werden (Dennehy and Brown 2007).

Die Rezeptoren werden auf verschiedenen Zellen expremiert. Der Mannose Rezeptor wird hauptsächlich auf Makrophagen, Keratinozyten, aber auch Hepatozyten und lymphatischen Zellen expremiert (Taylor, Gordon et al. 2005; McKenzie, Taylor et al. 2007).

Der Dectin-1 Rezeptor befindet sich auf dendritischen Zellen, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (Herre, Willment et al. 2004). TLR kommen ubiquitär vor (Muzio, Polentarutti et al. 2000).

1.5 Keratinozyten: Vorkommen, Differenzierung, Immunität und TLR

Die Haut besteht aus verschiedenen Schichten. Die oberste ist die Epidermis, bestehend aus mehrschichtigem verhornenden Plattenepithel. An die Epidermis schließt sich die bindegewebige Dermis an. Unter der Dermis befindet sich schließlich das subkutane Fettgewebe. Keratinozyten machen mit 90% den Hauptbestandteil der Zellen in der Epidermis aus. Neben den Keratinozyten besteht die Epidermis noch aus Melanozyten, dendritischen Zellen und Merkelzellen. Auf dem Weg vom Stratum basale bis zum Stratum corneum durchläuft der Keratinozyt verschiedene Differenzierungsstadien, angepasst an die jeweilige Epidermisschicht, in der er sich befindet (Moll 2005).

Aufgebaut ist die Epidermis aus verschiedenen Schichten mit jeweils spezifischen morphologischen und funktionellen Eigenschaften. Als unterstes, an die Dermis grenzend, befindet sich das Stratum basale. Das Stratum basale besteht aus einer Schicht hochprismatischer Basalzellen. Die Basalzellen sind Stammzellen, dass heißt, sie sind nicht endgültig differenziert und behalten ein Leben lang ihre Teilungsfähigkeit. Durch mitotische Teilung entstehen jeweils eine neue Stammzelle und eine differenzierungsfähige Tochterzelle (Alberts, Johnson et al. 2003). Über Hemidesmosomen sind die Basalzellen mit der Basallamina verbunden. An das Stratum basale schließt sich das Stratum spinosum an. Das Stratum spinosum besteht aus mehreren Schichten polygonaler Keratinozyten, die in höheren Schichten immer mehr abflachen. In der so genannten Stachelzellschicht sind die Keratinozyten über stachelförmige Ausläufer über Desmosomen miteinander verbunden. Die nächste Schicht bildet das Stratum granulosum. Die Kera-

tinozyten enthalten basophile Keratohyalin granula, welche ihnen den Namen Körnerzellen und entsprechend Körnerzellschicht verleiht.

Die äußerste Schicht schließlich ist das Stratum corneum. Es besteht aus flachen, festgepackten, kernlosen Hornzellen (Ulfig 2005).

Während der Wanderung durch die verschiedenen Schichten durchläuft der Keratinozyt verschiedene Differenzierungsstadien, in denen er im Wesentlichen von der Expression eines Satzes von Keratinen zu einem anderen Satz von Keratinen wechselt. Keratine sind eine Gruppe von Proteinen, die vor allem in Epithelzellen gebildet werden.

Die verschiedenen Stadien, die ein Keratinozyt auf dem Weg vom Stratum basale bis zum Stratum corneum durchläuft, nennt man terminale epidermale Differenzierung. Diesen Prozess kann man in verschiedene Stadien unterteilen. Das Synthesestadium im unteren Teil des Stratum spinosum ist gekennzeichnet durch rege Syntheseleistung jener Proteine, die für die Epidermis wichtig sind. Die wichtigsten sind die Tonofilamente, Bestandteile des Zytoskeletts und Desmosomen, verantwortlich für die Verankerung der Keratinozyten untereinander. Sie bewirken die mechanische Widerstandskraft der Epidermis gegen die Außenwelt. Mit weiter fortschreitender Differenzierung entstehen basophile Keratohyalin granula, amorphe Partikel, mit der Hauptaufgabe die Keratine zu bündeln. Im mittleren Stratum spinosum werden vom Golgi-Apparat die Membrane Coating Granules gebildet. Das sind lamelläre lipidreiche Körperchen, die von einer Plasmamembran begrenzt werden. Am Ende des Synthesestadiums bildet sich das so genannte marginale Band, welches sich an der inneren Plasmamembran anlegt und diese von innen abdichtet.

An das Synthesestadium schließt sich das Transformationsstadium an. Hier passiert die Umwandlung von lebenden Keratinozyten in kernlose Hornzellen. Am Anfang steht die Lyse aller Zellorganellen durch Enzymfreisetzung und Ca^{2+} -Ioneneinstrom. Des Weiteren werden die Membrane Coating Granules in den Interzellularraum ausgeschleust, wo sie die festhaftende fettreiche Interzellularsubstanz bilden. Sie ist maßgeblich für die Barrierefunktion zuständig.

An das Transformationsstadium schließt sich letztlich das Terminalstadium an. Es umfasst die kernlosen Hornzellen und amorphe Masse.

Die komplette Durchwanderung und Differenzierung dauert ungefähr vier Wochen.

Krankheitserreger, die in den Körper gelangen, müssen als erstes die Epidermis überwinden (Fritsch 2009).

Die Epidermis bietet - wie bereits erläutert - zum einen eine mechanische Barriere (Koster 2009). Zum anderen können die Keratinozyten eine Reihe von Mediatoren freisetzen, die an Entzündungsprozessen beteiligt sind. Das sind beispielsweise Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone, Neuropeptide, Arachidonsäurederivate, antimikrobielle Peptide und Enzyme. Die Freisetzung dieser Mediatoren wird über verschiedene Rezeptorsysteme vermittelt.

Keratinozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche die TLR1 bis 6 und TLR9, die wie bereits erwähnt, das Immunsystem maßgeblich beeinflussen (Miller 2008).

1.6 Zielsetzung

Wie bereits geschildert, sind die TLR eine wichtige Rezeptorfamilie des angeborenen Immunsystems, umso mehr da sie ubiquitär auf Zellen vorkommen. Sie spielen, neben verschiedenen anderen Rezeptoren, in der Erkennung von *C. albicans* eine entscheidende Rolle. Es gibt Berichte über die Bedeutung in anderen Zellen als den Keratinozyten, die ihre Relevanz belegen.

Beispielsweise wurde gezeigt, dass die Sekretion der Chemokine Keratinocyte-derived chemokine (KC) und Macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) in TLR4 defizienten murinen Makrophagen deutlich niedriger lag als in Wildtypmausmakrophagen, auch die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten war vermindert (Netea, Van Der Graaf et al. 2002). Die spezifische Blockierung von TLR2 auf mononukleären humanen Zellen ergab nach Stimulation mit *C. albicans*, eine verminderte Sekretion der Zytokine Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) und IL-1 β (Netea, Van Der Graaf et al. 2002). Verschiedene Studien belegen die vermehrte Anfälligkeit und Sterblichkeit eines Organismus bei provozierten Infektionen mit *C. albicans* bei Fehlen von TLR2 und 4. Allerdings sprachen diese Studien TLR2 eine größere Bedeutung in der Abwehr als TLR4 zu (Gil and Gozalbo 2006; Gil and Gozalbo 2009).

In dieser Arbeit soll untersucht werden, welche Rolle TLR2 und TLR4 sowie NF- κ B bei der Erkennung von *C. albicans* in Keratinozyten spielen.

Dies wird einerseits anhand der Aktivierung von NF- κ B in TLR2 und TLR4 defizienten murinen und humanen Keratinozyten untersucht. Andererseits untersuchen wir die Bedeutung der NF- κ B Untereinheit p65 für die Expression der NF- κ B Targetgene IL-1 β und IL-8 in zuvor mit *C. albicans* stimulierten humanen Keratinozyten.

Im *ersten Teil* der Arbeit wurden murine Keratinozyten untersucht. Dazu wurden Keratinozyten aus TLR2 und TLR4 defizienten Mäusen isoliert und mit *C. albicans* stimuliert. Im Anschluss an die Stimulation wurden die Proteine aus den Keratinozyten extrahiert. Die Proteine wurden sowohl auf Bindungen von NF- κ B mit der DNS als auch auf Aktivierung von NF- κ B durch Phosphorylierung von p65 hin untersucht.

Im *zweiten Teil* untersuchten wir die IL-1 β und IL-8 Sekretion in humanen immortalisierten TLR2 und 4 defizienten Keratinozyten. IL-1 β und IL-8 wurden als Targetgene von NF- κ B identifiziert und gaben so einen Aufschluss über die Aktivierung von NF- κ B. Wie bereits beschrieben, wird NF- κ B über die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade nach Aktivierung von TLR aktiviert. Wir gehen also davon aus, dass ein Anstieg der Zytokinexpression mit einer Aktivierung von NF- κ B gleich zu setzen ist.

Im *dritten Teil* untersuchten wir die Bedeutung der NF- κ B Untereinheit p65 in der Zytokinproduktion der Zytokine IL-1 β und IL-8.

Wir erwarten uns von dieser Arbeit größeren Aufschluss über die Bedeutung von TLR2, 4 und p65 in Keratinozyten bei der Abwehr des humanpathogenen Pilzes *C. albicans*.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Reagenzien und Medien

Acrylamid-Lösung 30%	(Biorad)
Actif-Motif-Kit	(Invitrogen)
Antioxidant	(Invitrogen)
Aqua bidets	(Braun)
γ (^{32}P) - ATP Radioaktivität	(Hartmann Analytics)
BSA	(Sigma)
Borsäure	(Roth)
Braunol Jodlösung	(Braun)
Chloroform	(Sigma)
CSH-Puffer:	
5mal CSH	200 μl
Triton*100 10%	10 μl
7*Complete Stock	150 μl
EGTA 10 mM	10 μl
Na-Orthovanadat	0,5 μ 100 μl
NaF 0,5 M	100 μl
Aqua ad 1 ml	520 μl
D+ Puffer	
HEPES	20 mM,ph 7,2
Glycerin	20%
KCl	100 mM
EDTA	0,5 mM,ph 8,0
NF-40	0,25%
DTT	2 mM

PMSF	0,1 mM
DMEM-Medium	(Gibco)
DMSO	(Fluka)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)-H₂O	
DTT	(Roche)
Diethylether	(Merck)
EDTA	(Merck)
ECL Plus Western Blotting Reagent	(Amersham)
EMSA-Mix:	
ddH ₂ O	4 μ l
BSA (10 ng/ μ l)	2 μ l
Poly- [didC]	2 μ l
D+ Puffer	2 μ l
5fach Ficoll Puffer	4 μ l
γ (³² P) markiertes Oligonukleotid	1 μ l
Ethanol	(Merck)
EMSA- Markierungsansatz	
ddH ₂ O	36 μ l
10 \times Kinasepuffer	5 μ l
Polynukleotidkinase T ₄ .	2 μ l
NF- κ B Oligonukleotid	2 μ l
Sense	5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'
Antisense	5'-TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCG-3'
γ (³² P)- ATP Radioaktivität	5 μ l
Expand Reverse Transkriptase	(Roche)

Ficoll-Puffer

Ficoll 400	20%
HEPES	100 mM, pH 7,2
KCl	300 mM
DTT	10 mM
PMSF	0,1 mM

Fetales Kälberserum (Biochrom)

Ficoll 400 (Amersham)

First Strand Puffer (Roche)

4-12% Bis Tris Gel (Invitrogen)

Glycerin (Roth)

Hanks-buffered salt solution (Gibco)

(HBSS)

HEPES (Gibco)

Isopropanol (Merck)

KCl (Merck)

Keratinozytenmedium (Gibco)

L-Glutamin (Gibco)

LightCycler TaqMan Master-Kits (Roche)

LPS (Sigma)

Lipofectamine RNSiMax (Invitrogen)

Methanol (Merck)

Milchpulver (Fluka)

NF- κ B Oligonukleotid (Promega)

dNTP (Roche)

dATP	20 µl
dTTP	20 µl
dCTP	20 µl
dGTP	20 µl
DEPC H ₂ O	120 µl
OPTIMEM-Medium	(Gibco)
PBS- Medium	(Apotheke)
Poly-dT-Oligo (250 ng/µl)	(Invitrogen)
Poly- [didC]	(Sigma)
Polynukleotidkinase T4	(New England Biolabs)
Protein assay	(Biorad)
PVDF-Membran	(Invitrogen)
Polyacrylamid-Gel:	
ddH ₂ O	60 ml
Acrylamid 30%	10 ml
10× TBE Puffer	3 ml
Ammoniumperoxidsulfat	400 µl
TEMED (Sigma)	40 µl
Primer RT-PCR	
TLR2	5'- CGTTCTCTCAGGTGACTGCTC- 3' 5'- TCTCCTTTGGATCCTGCTTG -3'
TLR4	5'- CTCTCCTGCGTGAGACCAG -3' 5'-TCCATGCATTGATAAGTAATATTAGGA-3'
p65	5'- CGG GAT GGC TTC TAT GAG G -3' 5'- CTC CAG GTC CCG CTT CTT -3'
IL-8	5'- AGA CAG CAG AGC ACA CAA GC -3' 5'- CAC AGT GAG ATG GTT CCT TCC -3'
IL-1β	5'- CTG TCC TGC GTG TTG AAA GA – 3'

HPRT	5'-TTGGGT AAT TTT TGG GATCTACA-3' 5'-TGACCTTGA TTT ATT TTGCATACC-3' 5'- CGA GCA AGA CGT TCA GTC CT -3'
RNSsin (40 u/μl)	(Promega)
Sonden	(Universal Probe Library)
4fach LDS Sample Buffer	(Invitrogen)
Sample Reducing Agent	(Invitrogen)
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard	(Invitrogen)
Trypsin	(Gibco)
Trisma Base	(Sigma)
Trizol	(Invitrogen)
TNF	(Sigma)
TBE 10 X	
Trisma Base	108 g
Borsäure	55 g
0,5 M EDTA	pH 8,0 40 ml
ddH ₂ O	1000 ml
Trizol	(Invitrogen)
Tween 20	(Fluka)
TEMED	(Sigma)
Transfer Buffer 20×	(Invitrogen)
Western Blot Waschpuffer	
PBS 1 X	500 ml
Tween20	500 μl

Western Blot Transferpuffer

Transfer Buffer 20×	25 ml
Antioxidant	0,5 ml
Methanol	50 ml
H ₂ O	424,5 ml

Western Blot Running Puffer

MES SDS Running Buffer 20×	50 ml
H ₂ O	950 ml

Western Blot Blocking Lösung**(100ml)**

Waschpuffer	90 ml
10×Blocking Solution	10 ml

YPD-Medium (Roth)**Zymosan** (Sigma)**2.2 Antikörper****B-Actin (Rabbit)** (Cellsignaling)**Pospho-NF- κ B Ser 536 (Rabbit)** (Cellsignaling)**NF- κ B p65 (Rabbit)** (Cellsignaling)**Anti-rabbit Ig** (Cellsignaling)**2.3 siRNS****CO3** 5'-GCG CAU UCC AGC UUA CGU ATT-3'**TLR2** 5'-GGG CAG UCU UGA ACA UUU ATT-3'**TLR4** 5'- CCA ACC AGG UGC AUU UAA ATT-3'**CO4** 5'-GCG CUA UCC AGC UUA CGU ATT-3'

p65

5'-GCC CUA UCC CUU UAC GUC ATT-3'

2.4 HaCaT-Zellen

HaCaT sind epidermale humane Keratinozyten. Sie sind immortalisiert aber nicht kanzerogen.

Obwohl sie eine Mutation im p53-Gen aufweisen, zeigen sie ein normales Differenzierungsverhalten.

2.5 Mäuse

Mausstamm	genetische Eigenschaft
C57BL/6JOlaHsd	Wildtypmäuse
C57BL/6JOlaHsd TLR2 ^{-/-}	TLR2 defizient
C57BL/6JOlaHsd TLR4 ^{-/-}	TLR4 defizient
C57BL/6JOlaHsd TLR2 ^{-/-} und TLR4 ^{-/-}	TLR2/4 defizient

Die Mutation wurde mittels PCR überprüft und bestätigt.

2.6 *Candida albicans*

Verwendet wurde Wildtyp *C. albicans* des Stamms SC5314

2.7 Geräte/Materialien

Autoklav	(Aigner)
Blot-Apparatur	(Invitrogen)
Blotting Pads	(Invitrogen)
Brutschrank	(Heraeus)
Elektrophoreseapparatur	(Invitrogen)

Entwicklungsapparatur	(Kodak)
Röntgenfilme	
EMSA Apparatur	(Owl Scientific)
EMSA Glasplatten	(Schubert und Weiß)
Geltrockner	(Biorad)
Gelfiltrationssäulen	(Stratagen)
HAT-Schüttel-Wärme-Inkubator	(Infors AG)
Hyperfilm	(Amersham)
Kapillaren	(Roche)
Kimig-Agar	
Laminar Air Flow Sterilbank	(Heraeus)
LightCycler	(Roche)
Mikroskop	(Zeiss)
Neubauer-Zählkammer	(Roth)
Nitrocellulose-Membran	(Stratagen)
Photometer	(Eppendorf)
ph-Meter	(WTW)
Pipetten	(Eppendorf)
Reaktionsgefäße	(Eppendorf)
Spritzen	(Eppendorf)
Thermomixer	(Eppendorf)
Thermocycler, RotoCycler	(Stratagene)
Tischzentrifuge, 545C Zentrifuge	(Eppendorf)
Whatman-Papiere	(Invitrogen)
Xcell SureLockmini-Cell-System	(Invitrogen)
Zentrifuge	(Roche)

2.8 Methoden

2.8.1 *C. albicans*-Synchronisierung

Für die Stimulation der Keratinozyten wurde der lebende *C. albicans* Stamm SC5314 verwendet. Die Stammsuspension wurde bei -20°C aufbewahrt. Um eine möglichst einheitliche Morphologie zu erhalten, wurden die *C. albicans* Zellen zu Beginn jedes Experiments synchronisiert.

Zuerst wurde mit Hilfe einer Platinimpföse *C. albicans* auf einen Kimig-Agar übertragen und im Brutschrank bei 37°C für 48 h angezüchtet.

24 h vor den Stimulationsversuchen wurden *C. albicans*-Kolonien mit einer Öse vom Agar genommen, in 10 ml PBS resuspendiert, bei 1500 U/min für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Danach wurde das Pilzpellet in 10 ml YPD-Medium aufgenommen und 24 h im Schüttelinkubator bei 150 U/min bei 37°C inkubiert.

Vor dem jeweiligen Versuch wurde das Pilzpellet erneut dreimal gewaschen und anschließend in 3 ml PBS resuspendiert. Um die Zellen zu zählen, wurde zunächst eine Verdünnung von 1:200 (1990 µl H₂O + 10 µl Pilzpellet) hergestellt. Danach wurden die Zellen mittels Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt:

$$(Zellzahl/2) \times 10^4 \times Vorverdünnung = Zellzahl/ml$$

Für die Stimulation wurde eine Verdünnung mit 10⁸ *C. albicans*- Zellen pro 100 µl hergestellt. Für die Versuche wurden jeweils 100 µl pro Well eingesetzt.

2.8.2 Extraktion von Keratinozyten aus Mäusen

Um die Keratinozyten extrahieren zu können, wurden die Mäuse zuerst mit Diethylether getötet. Danach wurden sie mit einer Schermaschine geschoren. Zur Desinfektion wurden die Mäuse für 3 min in Jodlösung getaucht, anschließend mit sterilem PBS gewaschen. Die Haut wurde mit einer sterilisierten Schere und Pinzette exzidiert, die Dermis soweit möglich vom Fettgewebe gelöst und in 1%ige Trypsinlösung über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Epidermis mit Hilfe von sterilisierten Pinzetten von der Dermis getrennt. Zur Homogenisierung, und um die Keratinozyten

von den verbliebenen Haaren zu trennen, wurde die Epidermis durch Siebe mit Hilfe von sterilen Spritzenstempeln in sterilisiertes PBS gedrückt.

Die Keratinozytensuspension wurde dreimal bei 1500 U/min zentrifugiert, der Überstand wurde jeweils verworfen.

Die Keratinozyten wurden in Keratinozytenmedium aufgenommen und mit der Neubauer- Zählkammer gezählt:

$$(Zellzahl/2) \times 10^4 \times Vorverd\u00fcnnung = Zellzahl/ml$$

Pro Maus konnten ca. 50.000 bis 100.000 Keratinozyten gewonnen werden.

Die Keratinozyten wurden auf 6-Well Platten gegeben. Pro Well wurden ca. 100.000 Keratinozyten in 2 ml Keratinozytenmedium ausgesät und im Brutschrank für 2 h inkubiert, bevor die Stimulation stattfand.

2.8.3 Kultivierung der HaCaT-Zellen

Die Zellen wurden in 10-15 ml DMEM-Medium mit den Zusätzen 10% FKS und 5 ml L-Glutamin bei 37°C mit 5% CO₂ begast und wasserdampfgesättigt in 200 ml Tissue Culture Flaks kultiviert

Zum Passagieren wurden die Zellen zweimal mit HBSS gewaschen, danach wurde einmal 6 ml Trypsin-EDTA zugegeben. Die Zellen wurden 5 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert, das Ablösen der Zellen mikroskopisch kontrolliert. Die Zellen wurden einmal gewaschen. Dazu wurden sie bei 1500 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen wieder in DMEM-Medium resuspendiert.

Danach wurden die Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt:

$$(Zellzahl/2) \times 10^4 \times Vorverd\u00fcnnung = Zellzahl/ml$$

Neu ausgesät wurde in einer Splitratio zwischen 1:5 - 1:10.

Passagiert wurden die Zellen zweimal pro Woche.

2.8.4 siRNS-Transfektion

Prinzip:

Mit Hilfe der siRNS-Transfektion werden spezifische Proteine auf Translationsebene an der Expression gehemmt.

Die siRNS wird in die Zelle eingebracht (transfiziert) und die mRNA des Zielgens wird abgebaut. Die Verringerung der Genprodukte ermöglicht es, Hinweise auf die physiologische Bedeutung des betreffenden Gens zu erhalten.

24 h vor Transfektion wurden 90.000 Zellen pro Well ausgesetzt.

Zur Standardtransfektion einer 6-Well Platte wurden pro Ansatz jeweils 1,5 μ l siRNS (20 μ M) mit 125 μ l OPTIMEM-Medium verdünnt.

Die RNSiMax-Verdünnung wurde zur siRNS-Verdünnung gegeben, beides vorsichtig gemischt und 10-20 min bei Raumtemperatur zur Komplexbildung stehengelassen.

Währenddessen wurden die Zellen, die zu 50-70% konfluent sein sollten, einmal mit HBSS gewaschen. Danach wurde 1250 μ l DMEM-Medium auf die Zellen gegeben.

Nach 10-20 min wurde das Transfektionsgemisch zu den Zellen gegeben (ad 1,5 ml).

Die siRNS-Endkonzentration betrug nun 20 nM. Es war kein erneuter Mediumwechsel vor Versuchsbeginn nötig. Versuchsbeginn war jeweils 48 h nach Transfektion.

2.8.5 Stimulation

2.8.5.1 HaCaT-Zellen

Die transfizierten HaCaT-Zellen wurden mit 10^8 in Zellsuspension vorliegenden *C. albicans*- Zellen 0, 3 und 6 h im Brutschrank bei 37°C stimuliert.

Als Positiv-Kontrolle wurden die Zellen eines Wells mit humanem TNF stimuliert.

Nach der Stimulation wurden entweder die Proteine oder die RNS isoliert.

2.8.5.2 Murine Keratinozyten

Die murinen Keratinozyten wurden ebenfalls pro Well mit 10^8 in Zellsuspension vorliegenden *C. albicans*- Zellen stimuliert.

Für Westernblot-Analysen wurden die Zeiträume 0-5-10-20-30 min, für EMSA-Analysen 0-1-2-3-4-5-6 h gewählt.

Als Positiv-Kontrolle bei EMSA-Analysen wurde bei den defizienten Keratinozyten und den Wildtypmäusen Phorbol-12-Mystat-Acetat (PMA) benutzt. Als Negativ-Kontrolle wurde bei TLR2^{-/-} defizienten Keratinozyten Zymosan (Z), bei den TLR4^{-/-} defizienten Keratinozyten Lipopolysaccharid (LPS) verwendet.

2.8.6 Proteinisolierung und Messung

2.8.6.1 Proteinisolierung aus murinen Keratinozyten

Da die murinen Keratinozyten nicht adhären waren, wurde der Überstand aus Medium und *C. albicans*-Zellen vorsichtig abpipettiert. Danach wurden die Keratinozyten in 2 ml PBS aufgenommen, zweimal bei 1500 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Keratinozyten in 60 μ l CSH-Puffer aufgenommen, 30 min auf Eis lysiert und bei 13000 U/min und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand, in dem sich das Gesamtprotein befand, wurde abpipettiert und bei -80°C gelagert.

2.8.6.1.1 Isolierung von nukleären Proteinen aus murinen Keratinozyten

Da für EMSA-Analysen nukleäre Proteine benötigt werden, wurden diese mit Hilfe und nach Anleitung des Herstellers mittels Actif-Motif-Kit isoliert.

2.8.6.2 Proteinmessung:

Die Proteinkonzentration wurde mittels Biorad-Proteinassay mit 5 μ l Lysat im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

Zuerst wurde jeweils eine Standardverdünnungsreihe von 2,5 μ g – 40 μ g mit BSA (1 mg/ml) hergestellt, danach wurden die Proteine gemessen.

Ein Ansatz bestand aus 795 μ l Wasser, 200 μ l BioRad Proteinassay und 5 μ l Lysat.

Die Ansätze wurden in eine Küvette pipettiert und im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

Die Proteinkonzentration der Probe wurde durch Vergleich der Extinktionen von Standardverdünnungsreihe und Probe erzielt.

2.8.7 RNS-Isolierung und Messung aus HaCaT-Zellen

Zur RNS-Isolation wurde das Reagenz Trizol verwendet, welches eine saure Mischung aus Phenol und Guadininisothiocyanat ist. Es lysiert die Zellen und stabilisiert gleichzeitig die RNS. Durch Zugabe von Chloroform wird die Lösung in eine wässrige und eine phenolische Phase aufgetrennt, die RNS befindet sich in der wässrigen Phase. In der phenolischen Phase befinden sich Proteine und DNS.

Präpariert wird die Gesamt-RNS. Generell wurden gestopfte Pipettenspitzen und autoklavierte 1,5 ml Tubes verwendet. Gearbeitet wurde unter dem Laminar Flow.

Zunächst erfolgte die Zugabe von 1 ml Trizol in jeweils ein Well. Den Ansatz ließ man 5 min bei Raumtemperatur stehen. Dann wurde das zähflüssige Lysat mit einem Zellschaber vom Boden gelöst, zum Rand gestrichen und mit einer Pipette in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben.

Zur Phasenseparation wurde 200 μ L Chloroform hinzugegeben. Die Eppendorf-Gefäße wurden 15 sec lang kräftig geschüttelt und dann für 3 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurde das Trizol-Chloroform-Gemisch bei 14000 rpm und 4°C 15 min zentrifugiert, wobei es zur Entmischung der Phasen kam. Die obere farblose Phase enthielt die RNS.

Die obere wässrige Phase, ca. 450 μ l, wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Zur Fällung der RNS wurde 500 μ l Isopropanol hinzu gegeben. Das Gemisch ließ man bei Raumtemperatur 10 min stehen. Danach wurde es 20 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das RNS-Pellet wurde zweimal mit 1 ml 70% eiskaltem Ethanol gewaschen.

Nach dem Waschen wurde das Pellet unter dem Flow getrocknet und in 30 μ l DEPC-Wasser rückgelöst. Dazu wurde es 2-3 h auf Eis gestellt und ab und zu gevortext.

2.8.7.1 RNS-Messung

Gemessen wurde die RNS mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm. Dazu wurde jeweils ein Ansatz bestehend aus 76 μ l TRIS-Puffer 10 mM und 4 μ l Probe hergestellt.

2.8.8 EMSA

Mit Hilfe des EMSAs kann die Aktivierung von NF- κ B durch dessen Bindung an der spezifischen Promotorsequenzen der DNS untersucht werden.

Zuerst wurden die nukleären Proteinlysate zusammen mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid aus einer konservierten, für NF- κ B spezifischen Promotorsequenz inkubiert. Befindet sich aktives NF- κ B im Proteinextrakt, kommt es zur Ausbildung von DNS-Proteinkomplexen mit dem Oligonukleotid.

Zum Abfangen von unspezifischen DNS-bindenden Proteinen wurde Poly-[didC] (Poly-desoxyinosindesoxycytidinsäure) zum Ansatz gegeben. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde BSA hinzugefügt.

Bei der anschließenden elektrophoretischen Auftrennung mittels Polyacrylamid Gelelektrophorese, welche unter nativen Bedingungen stattfindet, liefen die DNS-Proteinkomplexe wegen ihres höheren Molekulargewichts langsamer als die freie Sonde.

Die DNS-Proteinkomplexe wurden zum Schluss auf einem Röntgenfilm exponiert.

Radioaktive Markierung des Oligonukleotids:

Es wurden doppelsträngige Oligonukleotide einer für NF- κ B spezifische Konsensussequenz aus dem Enhancer des κ -Leichtkettengens verwendet. Der Transfer des Betastrahlers ^{32}P vom γ -Posphat des ATP-Moleküls auf das OH'-Ende des Oligonukleotids erfolgte mit der Polynukleotidkinase T_4 .

Die Markierung erfolgte im Isotopenlabor. Der Markierungsansatz enthält 36 μ l ddH₂O, 5 μ l 10 \times Kinasepuffer, 2 μ l T_4 Kinase, 2 μ l NF- κ B Oligonukleotid und 5 μ l radioaktives γ -(^{32}P) dATP (3000 Ci pro mmol). Der Ansatz wird bei 37°C für 30 min inkubiert. Danach wurde er mittels Gelfiltrationssäule aufgereinigt, um freies γ (^{32}P)-dATP abzutrennen.

EMSA-Mix:

Aus dem DNS-Protein-Komplex wurden 5 μ l des Proteinextrakts (10-15 μ g Protein) mit 15 μ l EMSA-Mix für 25 min bei Raumtemperatur inkubiert.

EMSA-Mix:

4 μ l ddH₂O

2 μ l BSA (10 ng/ μ l)

2 μ l Poly-[didC]

2 μ l D+ Puffer

4 μ l 5fach Ficoll Puffer

1 μ l γ (³²P) markiertes Oligonukleotid

Dieser Reaktionsansatz wurde in die Geltaschen eines frisch hergestellten 4%-igen Polyacrylamid-Gels pipettiert. Das Gel wurde hergestellt, indem man 60 ml ddH₂O, 10 ml Acrylamid 30%, 3 ml 10 \times TBE Puffer, 400 μ l Ammoniumperoxidsulfat als Radikalstarter und 40 μ l TEMED als Radikalstabilisator in einem Erlenmeyerkolben vermischte.

Anschließend wurde das Reservoir mit 0,5 \times TBE Laufpuffer aufgefüllt und die Proteine bei 200 V aufgetrennt.

Danach wurde das Gel auf 3MM Whatman-Papier für 60 min bei 80°C vakuumgetrocknet und in einer Kassette mit einem Röntgenfilm bei – 80°C für 24 h exponiert.

2.8.9 Westernblot

Mittels der Westernblot Analyse können Proteine in Zell- und Gewebeextrakten nachgewiesen werden. Dazu wurden sie zuerst ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Anschließend wurden sie auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert.

Nach dem Transfer wurde der Primärantikörper, der spezifisch das gewünschte Protein erkennt, mit der Membran zusammen inkubiert. Danach wurde der Sekundärantikörper, der den Primärantikörper erkennt, mit der Membran inkubiert. Der Sekundärantikörper war mit HRP markiert und kann so mit Chemilumineszenz detektiert werden.

Gelelektrophorese:

Für die Auftrennung wurden jeweils 10 μ g Protein mit 4fach LDS Sample Buffer und Sample Reducing Agent versetzt und für 10 min bei 70°C denaturiert.

Die Auftrennung erfolgt in 4-12% Bis Tris Gelen (Invitrogen) bei 150V für 35-50 min. Verwendet wird das XCell SureLockmini-Cell-System (Invitrogen). Als Laufpuffer wurde MES SDS Running Buffer verwendet. Als Marker wurde 15 μ l SeeBlue Plus 2 Pre-Stained Standard (Auftrag 10-15 μ l) verwendet.

Proteintransfer:

Mit Hilfe der Semidrytechnik konnten in einer Blottingkammer die im Gel augetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert werden.

Die PVDF-Membran wurde vorher für 30 sec mit Methanol aktiviert, mit H₂O 2 min gewaschen und für 15 min in Transferpuffer gelegt. Das Gel, 2 Whatman-Papiere und 4 Blotting Pads wurden in Transferpuffer angefeuchtet.

Die Blot-Apparatur wurde wie folgt aufgebaut:

Positiv Kathode (+)

2 Blotting Pads

1 Whatman-Papier

Membran

Gel

1 Whatman-Papier

2 Blotting-Pads

Negativ Anode (-)

Die negativ geladenen Proteine wanderten aus dem Gel in die Membran zur Kathode.

Es wurde für 1 h bei 30V geblottet.

Immunedektion:

Danach wurde die Membran für mindestens 1 h bei Raumtemperatur und unter ständigem Schütteln in Blocking-Lösung inkubiert. Nach dem Blockieren, wurde die Membran dreimal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen.

Der Primärantikörper wurde den Herstellerhinweisen entsprechend in Blockier-Lösung verdünnt und mit der Membran über Nacht unter ständigem Schütteln inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran wieder dreimal für 10 min gewaschen. Danach wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper, den Herstellerhinweisen entsprechend verdünnt, in Blocking-Lösung für 1 h inkubiert und dann wieder dreimal für 10 min gewaschen.

Zur Detektion der HRP-markierten Proteine wurde ein Chemiluminiszenzverfahren angewandt (ECL Plus-Western Blotting Detection Reagent). Vor Gebrauch wurden Reagenz A und B im Verhältnis 1:40 gemischt und die Membran für 5 min mit 2 ml Detection Reagent inkubiert. Danach erfolgte die Exposition auf einem Hyperfilm.

2.8.10 Real-Time PCR (RT-PCR)

Damit man RNS mit Hilfe der Polymersaekettenreaktion (PCR) vervielfältigen kann, hybridisiert man einen Primer an die RNS-Matrize und erstellt mittels der Reversen Transkriptase (RT) und einer anschließenden PCR eine cDNS-Kopie. Mit der RT-PCR Genexpression auf RNS Ebene untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurde zum Umschreiben von RNS in cDNS 1 μ g RNS eingesetzt.

Poly-dt-Oligo annealing:

Der Reaktionsansatz wurde hergestellt aus:

2 μ l Poly-dT-Oligo (250 ng/ μ l)

1 μ g RNS

(DEPC-H₂O ad 10,5 μ l)

Dieser Reaktionsansatz wurde bei 65°C für 10 min im Thermocycler inkubiert. Nach den 10 min wurde der Ansatz sofort auf Eis gestellt, die entstandene annealed RNS war bereit für die RT-Transkription.

RT-Transkription:

Es wurde erneut ein Reaktionsansatz hergestellt, bestehend aus:

10,5 μ l annealed RNS

4 μ l First Strand Puffer

2 μ l DTT

2 μ l dNTP

0,5 μ l RNasein (40 u/ μ l)

1 μ l Expand Reverse Transkriptase

Dieser Reaktionsansatz wurde bei 40°C für 1 h im Wasserbad inkubiert, danach auf Eis gestellt und 40 μ l Aqua bidest hinzugefügt. 100 ng cDNS entsprachen 6 μ l.

Die cDNS wurden bis zu ihrem Gebrauch bei – 80 °C gelagert.

LightCycler-PCR mit Sonde:

Das Prinzip der LightCyclermessung mit Sonde besteht darin, dass eine kurze DNS-haltige Probe im Bereich zwischen den Primern hybridisiert. Sie ist am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff und am 3'-Ende mit einem Quencher markiert. Durch die räumliche Nähe unterdrückt der Quencher die Fluoreszenz des Farbstoffs. Ferner ist die Sonde am 3'-Ende phosphoryliert, damit eine Verlängerung des 3'-Endes durch die Polymerase nicht erfolgen kann.

Neben der Verlängerung des 3'-Endes hat die Polymerase eine 5' Exonukleaseaktivität. Während der Verlängerung spaltet die Polymerase das 5'-Ende der Sonde ab, wenn sie während der Extension zur hybridisierten Sonde gelangt. Durch die Spaltung wird der Farbstoff vom Quencher getrennt, wodurch es zum Fluoreszenzsignal kommt, welches nun gemessen werden kann. Die Spaltung ist nur bei Hybridisierung der Probe möglich.

Reaktionsansatz:

Verwendet wurden die Reagenzien des LightCycler TaqMan Master-Kits. Die Sonden stammten von der Universal Probe Library.

Der Reaktionsansatz wurde in gleicher Reihe wie aufgelistet in n-fachem Ansatz auf Eis in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert und mit der Pipette gemischt.

4 μ l Aqua

0,1 μ l Sonde (10 μ M)

0,2 μ l Primer forward (10 μ M)

0,2 μ l Primer reverse (10 μ M)

2,0 μ l 5X Mastermix

7 μ l des Reaktionsansatzes wurden in eine gekühlte Glaskapillare pipettiert, dazu wurden 3 μ l cDNS pipettiert. Die Kapillare wurde bei 1000 U/min in einer Tischzentrifuge für 1 min herunterzentrifugiert.

PCR- Bedingungen:

Die Zykluszahl betrug 40- 45.

Präinkubation:	10 min 95°C
Vervielfältigung:	
Denaturierung:	10 sec 95°C
Aufheizen:	30 sec 60°C
Verlängerung:	1 sec 72°C
Kühlung:	30 sec 40°C

Relative Quantifizierung:

Für die relative Quantifizierung wird eine interne Kontrolle benötigt. Eine interne Kontrolle kann ein Gen-Transkript sein, dessen Signal verwendet wird, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNS auszugleichen. Dies wird als Normierung bezeichnet. Weil die Gesamtanalyse auf diesem Signal beruht, ist die Wahl der internen Kontrolle ein wichtiger Aspekt des Experiments. Die ideale interne Kontrolle ist leicht zu detektieren, und deren Expression sollte nicht während des Zellzyklus, zwischen Zelltypen oder als Antwort auf die experimentelle Behandlung (z. B. Stress, Medikamente, Krankheit) variieren. Für die Quantifizierung wurde in dieser Arbeit die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) als Referenz-Gen verwendet. HPRT ist ein Enzym des Purinstoffwechsels und kommt somit ubiquitär in allen Zellen mit Zellkern vor.

Berechnung mit Hilfe einer Standard-Kurve:

Um immer am Anfang der exponentiellen Phase messen zu können, wird häufig der CT-Wert (engl. Cycle Threshold für Schwellenwert-Zyklus) bzw. der CP-Wert (engl. Crossing Point) verwendet, der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

Es besteht eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge und dem CT. Ist die Ausgangsmenge bekannt, kann eine Standardkurve durch Auftragen des Logarithmus der Ausgangsmenge gegen den CT konstruiert werden. Durch die Geradengleichung

$$x = (CT - b) / m$$

kann an der Standardkurve für jede unbekannte Probe der Logarithmus der Kopienzahl bestimmt werden. Alle Proben werden normiert, indem die errechnete Kopienzahl des Targetgens durch die Kopienzahl der internen Referenz geteilt wird:

$$\text{Gen (normiert)} = \text{Kopienzahl Target} / \text{Kopienzahl Referenz}$$

Die unterschiedliche Expression zweier Proben relativ zueinander lässt sich als Quotient darstellen und ergibt eine n-fache Expression:

$$\text{Gen A (normalisiert)} / \text{Gen B (normalisiert)} = n\text{-fache Expression Gen A zu Gen B.}$$

Maßeinheit ist so genannte relative Einheit (relativ Unit).

3 Ergebnisse

NF- κ B wird durch verschiedene Stimuli, zum Beispiel Stress, Viren, Bakterien oder Pilzen aktiviert. Die folgenden Expressionsanalysen umfassen Untersuchungen auf Protein- und mRNA Ebene in murinen, primären Keratinozyten und immortalisierten humanen Keratinozyten.

Die Ergebnisse wurden in drei Abschnitte unterteilt:

Im *ersten Abschnitt* dieser Arbeit wurde untersucht, ob es in murinen Keratinozyten zur Aktivierung der NF- κ B Untereinheit p65 durch *C. albicans* kommt. Hierzu wurde auf Proteinebene die Aktivierung von p65 im Westernblot und EMSA analysiert.

Im *zweiten Abschnitt* wurde untersucht, inwieweit die Hemmung von TLR2 und TLR4 in humanen Keratinozyten zum Anstieg der Zytokinproduktion der typischen NF- κ B Targetgene IL-1 β und IL-8 führt. Auf mRNA Ebene wurde die Expression mittels quantitativer RT-PCR bestimmt.

Abschließend wurde im *dritten Abschnitt* untersucht, ob die NF- κ B Untereinheit p65 in der Zytokinproduktion der typischen NF- κ B Targetgene IL-1 β und IL-8 in humanen Keratinozyten beteiligt ist. Hierzu wurden, wie im zweiten Abschnitt, mRNA Expressionsanalysen durchgeführt.

3.1 Murine Keratinozyten

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde untersucht, ob es zu einer Aktivierung der NF- κ B Untereinheit p65 in murinen Keratinozyten nach einer Stimulation mit *C. albicans* kam. Es erfolgten Proteinanalysen mittels Westernblot und EMSA.

Die Aktivierung der NF- κ B Untereinheit p65, im Sinne einer Bindung an die DNS, wurde in murinen Keratinozyten mit Hilfe von EMSA Analysen nachgewiesen. Die TLR Defizienz wurde vorher mittels PCR bestätigt.

Als Kontrollen dienten Zymosan und LPS.

Zymosan wird von der extrazellulären Domäne von TLR2 erkannt (Sato, Sano et al. 2003) und diente deshalb in den Versuchen mit den TLR2 defizienten Keratinozyten als Negativkontrolle. Bei Zymosan handelt es sich um Zellwandbestandteile von Sac-

Saccharomyces cerevisiae, einem Hefepilz. In den TLR4 Versuchen wurde LPS als Negativkontrolle eingesetzt. Bei LPS handelt es sich um ein Lipopolysaccharid, welches ein Bestandteil der Hülle von gramnegativen Bakterien ist. Dieses LPS wird von TLR4 erkannt (McGettrick and O'Neill 2010).

Zymosan und LPS werden gleichzeitig auch als Positivkontrollen eingesetzt.

In den Abbildungen sind jeweils die Kontrollen vorangestellt. Es folgen die Stimulationszeitpunkte 0 h – 6 h.

Die EMSA- und Westernblot Abbildungen sind repräsentativ für jeweils 3 unabhängige Experimente.

3.1.1 Aktivierung von p65 in murinen Wildtypkeratinozyten nach Stimulation mit *C. albicans*

EMSA Wildtyp murine Keratinozyten

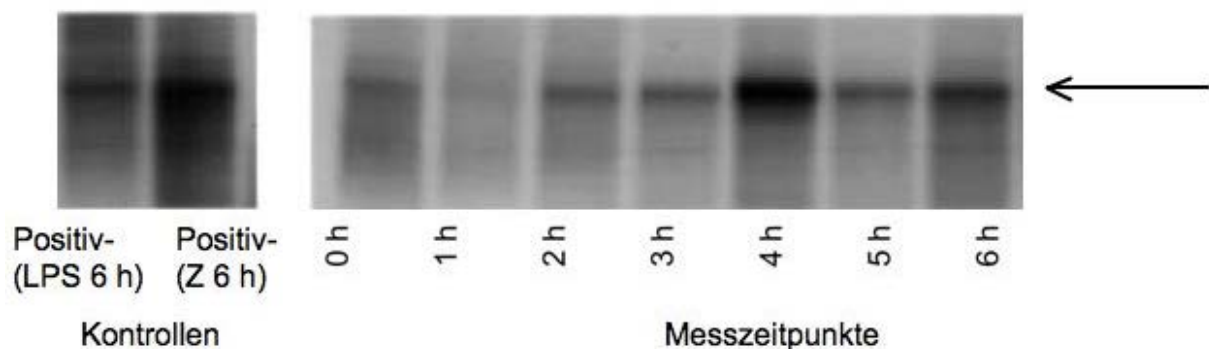


Abbildung 4

Bindung von p65 an die DNS muriner Keratinozyten

EMSA Analyse von nukleären mit *C. albicans* stimulierten Proteinen. Als Bindungs sonden wurde ein radioaktiv markiertes Oligonuklid der entsprechenden NF- κ B Konsensussequenz verwendet.

Der Pfeil (\leftarrow) zeigt auf die Bindung der NF- κ B Untereinheit p65 an die DNS. Die Kontrollen Z (= Zymosan) und LPS sind vorangestellt. Die Messzeitpunkte sind in Stunden (h) angegeben.

Im vorliegenden Versuch (Abbildung 4) erkannte man eine Bindung von p65 an die murine DNS.

Die Bindung schien bereits beim 0 h Zeitpunkt vorzuliegen. Am 1 h Zeitpunkt nahm die Bindungsintensität ab, um bis zum scheinbaren Maximum bei 4 h wieder über die Stärke beim 0 h Zeitpunkt anzusteigen. Danach verliert die Bindung an Intensität. Die Positivkontrollen LPS und Zymosan zeigten ebenfalls eine Bindung von p65 an die DNS.

3.1.2 TLR2 und TLR4 abhängige Aktivierung von p65 nach Stimulation mit *C. albicans* (EMSA Analysen)

EMSA TLR2^{-/-} murine Keratinozyten

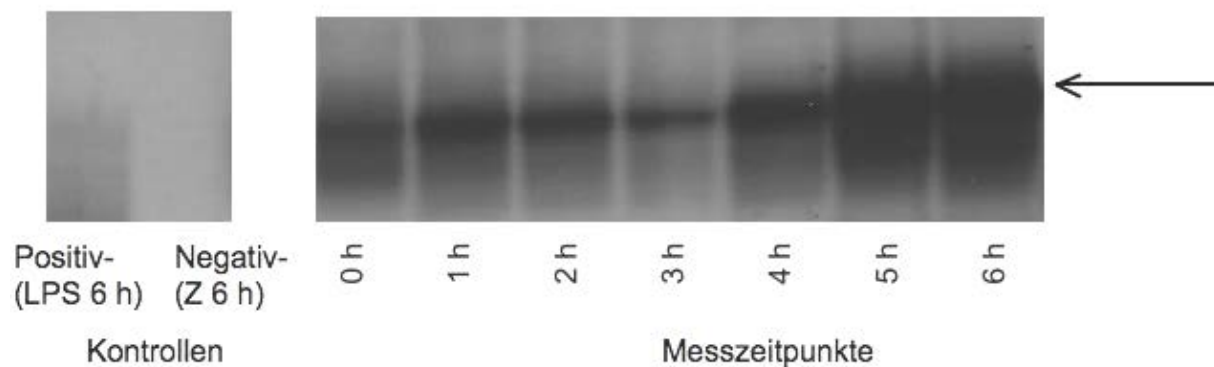


Abbildung 5

Bindung von p65 an die DNS TLR2 defizienter muriner Keratinozyten

EMSA Analyse von nukleären, mit *C. albicans* stimulierten TLR2 defizienten Keratinozyten. Der Pfeil (\leftarrow) zeigt auf die Bindung der NF- κ B Untereinheit p65 an die DNS. Die Kontrollen Z (= Zymosan) und LPS sind vorangestellt. Die Messzeitpunkte sind in Stunden (h) angegeben.

Man erkannte in den TLR2 defizienten murinen Keratinozyten in Abbildung 5 auf Proteinebene eine Bindung der NF- κ B Untereinheit p65 an die DNS. Es zeigte sich ein scheinbar vorstimulierter 0h Zeitpunkt, eine leichte Abnahme der Stimulation von 1 h nach 3 h, gefolgt von einem Wiederanstieg der Stimulation bis 6 h. Die Negativkontrolle zeigt keine Bindung, die Positivkontrolle eine nur schwache Bindung.

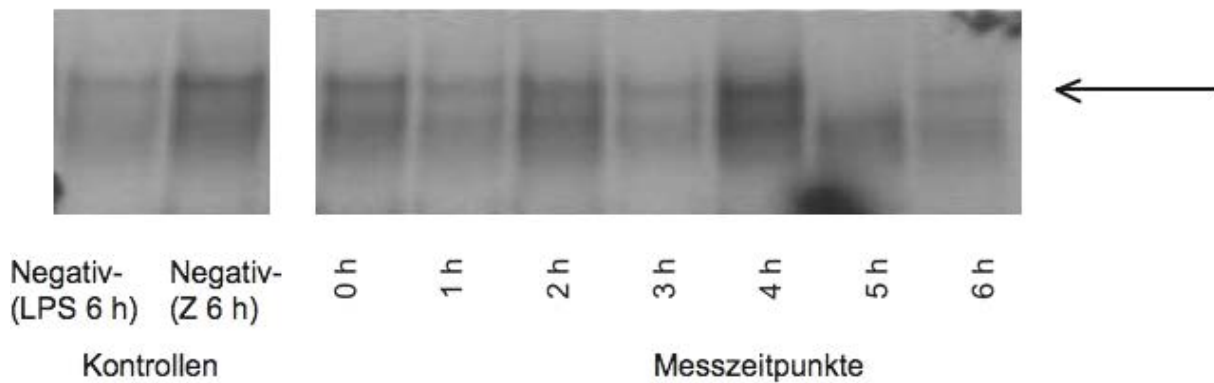
Positiv-(Z 6 h) Negativ-(LPS 6 h)

0 h 1 h 2 h 3 h 4 h 5 h 6 h

Kontrollen Messzeitpunkte

Bindung von p65 an die DNS TLR4 defizienter muriner Keratinozyten

Auch bei den TLR4 defizienten Keratinozyten translozierte NF- κ B in den Zellkern und band an die DNS (Abbildung 6). Die Bindung zeigte sich bis auf den abweichenden 3 h Zeitpunkt ausgesprochen homogen, es konnte kein Maximum nachgewiesen werden. Die Positivkontrolle Z (= Zymosan) zeigt scheinbar weniger Intensität als die LPS Negativkontrolle, die Bindung an die DNS konnte aufgrund eines sehr stark ausgeprägten Hintergrundes aber nur schwer beurteilt werden konnte.

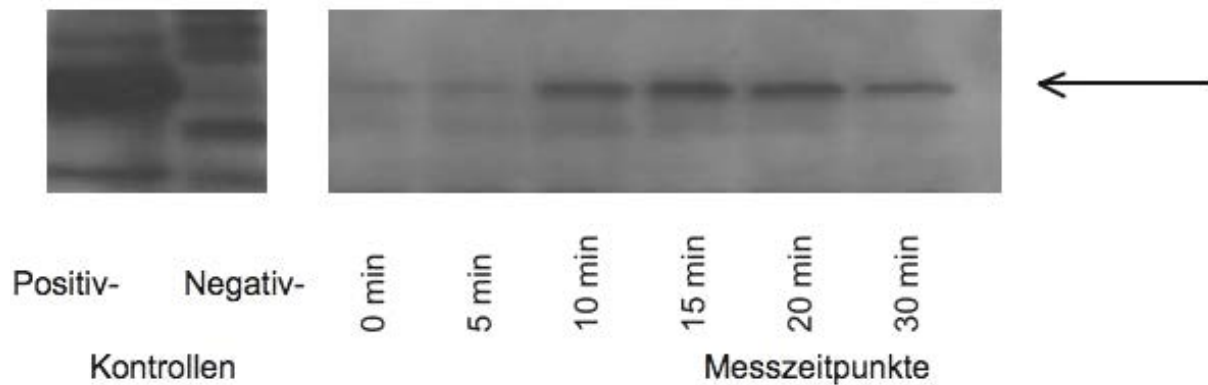
EMSA TLR2^{-/-} und TLR4^{-/-} murine Keratinozyten**Abbildung 7****Bindung von p65 an die DNS TLR2 und 4 defizienter muriner Keratinozyten**

EMSA Analyse von nukleären, mit *C. albicans* stimulierten TLR2 und 4 defizienten Keratinozyten. Der Pfeil (←) zeigt auf die Bindung der NF- κ B Untereinheit p65 an die DNS. Die Kontrollen Z (= Zymosan) und LPS sind vorangestellt. Die Messzeitpunkte sind in Stunden (h) angegeben.

Auch bei den Doppelknockout Mutanten sah man eine Bindung von p65 an die DNS. Die Negativkontrollen zeigten, wie auch der 0 h Zeitpunkt, eine Vorstimulation. Ein scheinbares Maximum lag jeweils bei 2 h und 4 h.

3.1.3 Phosphorylierung von p65 nach Stimulation mit *C. albicans*

Die Aktivierung von NF- κ B durch Phosphorylierung wurde mittels Westernblot-Analysen untersucht. Nachgeprüft wurde die Phosphorylierung anhand der Detektion von phosphoryliertem p65. Die Stimulationszeitpunkte betrugen 0 - 30 min (0 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min). Analysiert wurde das Gesamtprotein, das heißt sowohl zytosolisches als auch nukleäres Protein. Als Kontrollen wurden die Extrakte aus dem Western Blot Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Westernblot muriner Wildtypkeratinozyten**Abbildung 8****Kinetik der Phosphorylierung von p65**

Westernblot Analyse von mit *C. albicans* stimulierten murinen Wildtyp Keratinozyten. Der Pfeil (\leftarrow) zeigt die Bande des phosphorylierten p65 an. Untersucht wurde das Gesamtprotein, nukleäres und zytosolisches Protein. Die Messzeitpunkte sind in Minuten (min) angegeben.

Um die phosphorylierten Proteine nachweisen zu können, wurden Westernblot Analysen durchgeführt (Abbildung 8). Man sah eine linear ansteigende Zunahme der Phosphorylierung mit einem möglichen Maximum bei 15 min. Danach kam es zu einem leichten Rückgang der Phosphorylierung. Der 0 min Zeitpunkt zeigte ebenfalls eine leichte Phosphorylierung.

Zusammenfassung:

In den vorliegenden Experimenten mit murinen Keratinozyten konnte in dem Versuch mit den murinen Wildtypkeratinozyten eine ansteigende Kinetik mit einem scheinbaren Maximum bei 4 h bei scheinbarer Vorstimulation gezeigt werden.

Die Proteinanalyse der murinen Keratinozyten mittels Westernblot zeigte eine zunehmende Phosphorylierung von p65 mit einem möglichen Maximum bei 15 min bei einer scheinbaren Vorstimulation. Nach den 15 min kam es zu einem Rückgang der Phosphorylierung.

In den TLR2 und TLR4 Experimenten sah man trotz Hemmung von TLR2 und TLR4 in den EMSA Analysen in allen 3 Versuchsgruppen eine Bindung der NF- κ B Untereinheit p65 an die DNS, wobei eine scheinbare Kinetik nur bei den Versuchen mit TLR2 und TLR2/TLR4 zu beobachten war. In allen Versuchen lag bereits beim 0 h Zeitpunkt eine Bindung von p65 an die DNS vor, somit lag scheinbar eine Vorstimulation vor.

In den TLR4 defizienten Keratinozyten kam es zwar zur Bindung von NF- κ B an die DNS, aber diese war sehr homogen und durchgehend vorhanden, so dass eine Stimulation bezweifelt werden kann.

3.2 HaCaT (humane Keratinozyten)

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Relevanz von TLR2 und TLR4 bei der Erkennung von *C. albicans* in humanen Keratinozyten auf mRNS Ebene anhand der Expression zweier typischer Targetgene von NF- κ B, IL-1 β und IL-8, untersucht. Hierzu wurde die Expression von TLR2 und TLR4 auf mRNS Ebene gehemmt und die gewonnene mRNS mittels quantitativer PCR auf die Expression von IL-1 β und IL-8 untersucht. Als Kontrollen dienten unstimulierte und ungehemmte humane Keratinozyten (UNTR) und ungehemmte mit TNF für 6 h stimulierte humane Keratinozyten. Gleichzeitig wurde die Expression des jeweils nicht gehemmten Rezeptors bestimmt.

3.2.1 Hemmung von TLR2 und TLR4

TLR2 Hemmung in humanen Keratinozyten

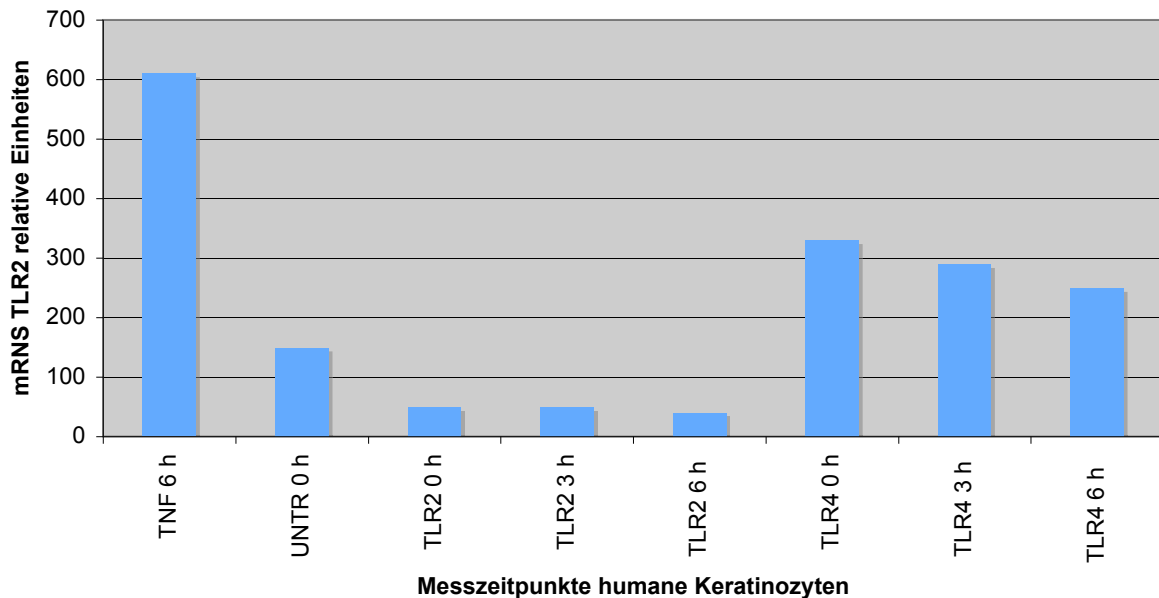


Abbildung 9

Hemmung von TLR2

RNS Analyse der Expression von TLR2 mittels quantitativer RT-PCR. Die X-Achse zeigt die verschiedenen Messzeitpunkte, die Y-Achse die relativen Einheiten. Die Ergebnisse wurden in relativen Einheiten ausgedrückt.

Die Expression von TLR2 ist gegenüber den Kontrollen zu allen Zeitpunkten gleichmäßig erniedrigt (Abbildung 9). Die Expression von TLR2 ist in den mit TNF stimulierten Zellen deutlich gesteigert. Auch zeigte sich die Expression von TLR2 in den TLR4 gehemmten Keratinozyten deutlich erhöht zu den unstimulierten Keratinozyten. Die Expression scheint hier von 0 h bis 6 h kontinuierlich abzunehmen.

TLR4 Hemmung in humanen Keratinozyten

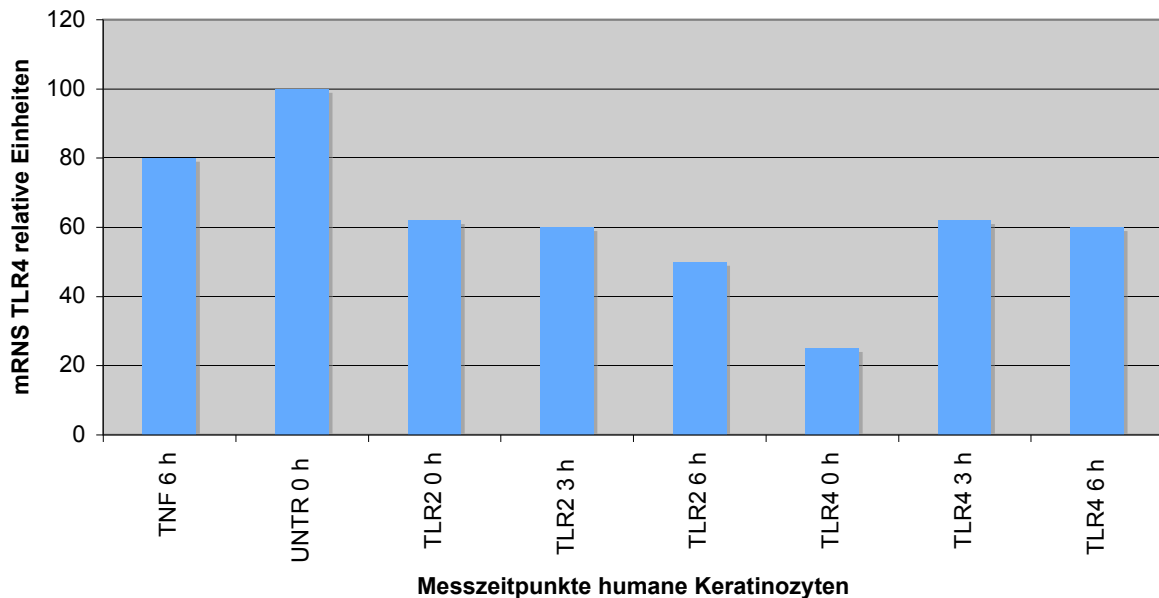


Abbildung 10

Hemmung von TLR4

RNS Analyse der Expression von TLR4 mittels RT-PCR. Die X-Achse zeigt die verschiedenen Messzeitpunkte, die Y-Achse die relativen Einheiten. Die Ergebnisse wurden in relativen Einheiten ausgedrückt.

Die Expression von TLR4 zeigte sich gegenüber der unstimulierten und ungehemmten Kontrolle sowie der mit TNF stimulierten Kontrolle erniedrigt (Abbildung 10). Die TLR2 gehemmten Keratinozyten zeigten eine ähnliche Restexpression von TLR4 wie die TLR4 gehemmten Zellen selber.

3.2.2 TLR2 und TLR4 abhängige Expression von IL-1 β und IL-8 nach Stimulation mit *C. albicans*

IL-1 β Expression in humane Keratinozyten nach TLR2 und TLR4 Hemmung

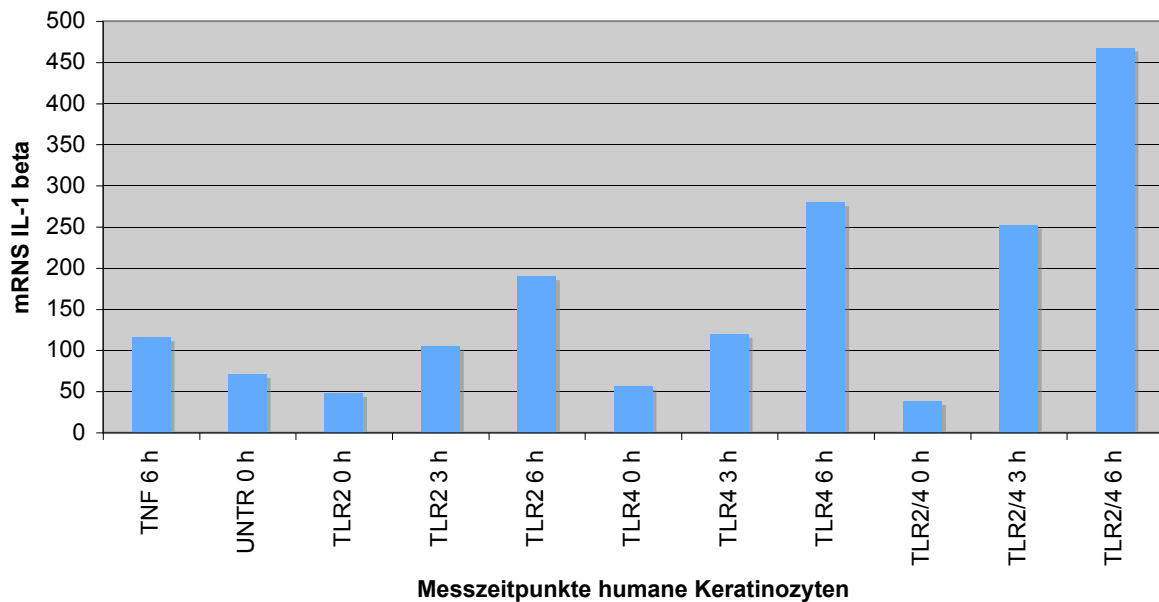


Abbildung 11

TLR2, TLR4 und TLR2/4 abhängige IL-1 β Expression

RNS Analyse mittels RT-PCR. Die X-Achse stellt die Messzeitpunkte und die Y-Achse die gemessenen relativen Einheiten dar.

Man konnte in dem vorliegenden Versuch (Abbildung 11) eine ansteigende Expression von IL-1 β erkennen. Das Minimum lag beim 0 h Zeitpunkt, das Maximum beim 6 h Zeitpunkt. Dieser Sachverhalt galt sowohl für die Kontrollgruppen als auch für die eigentlichen Versuchsgruppen (TLR2, TLR4 und TLR2/4). Die stärkste Expression von IL-1 β zeigten die TLR2/4 defizienten Keratinozyten. Die Expression der 6 h Zeitpunkte lag jeweils über dem Niveau der TNF Stimulation.

IL-8 Expression in humane Keratinozyten nach TLR2 und TLR4 Hemmung

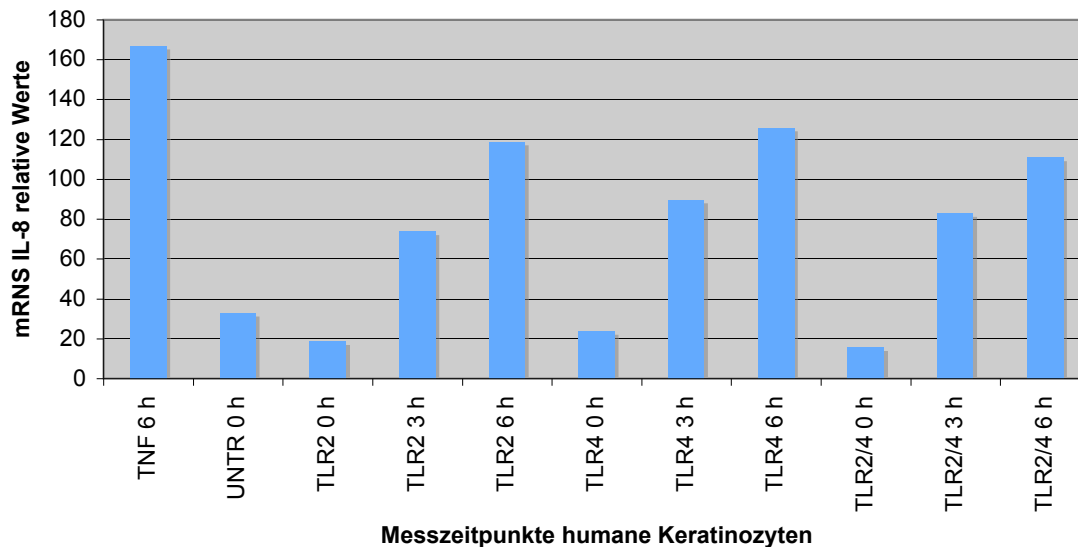


Abbildung 12

TLR2, TLR4 und TLR2/4 abhängige Expression von IL-8

Analyse der Expression von IL-8 anhand mittels RT-PCR. Die X-Achse stellt die Messzeitpunkte und die Y-Achse die gemessenen relativen Einheiten dar.

Es zeigte sich eine ansteigende Expression von IL-8 trotz Hemmung von TLR2, TLR4 und TLR2/4 (Abbildung 12). Die Ausprägung des Anstiegs war bei den Versuchsgruppen annähernd gleich stark ausgeprägt.

Die Positivkontrolle TNF zeigte eine starke Expression von IL-8 über das Niveau der gehemmten Zellen hinaus.

Zusammenfassung:

In den oben aufgeführten Experimenten konnte eine Expression der Zytokine IL-1 β und IL-8 auf mRNA Ebene trotz Hemmung der Rezeptoren TLR2, TLR4 und TLR2/4 nachgewiesen werden. Es kam jeweils zu einem linearen Anstieg der Expression.

3.2.3 Expression von IL-1 β und IL-8 in humanen Keratinozyten nach Hemmung von p65

Die Ergebnisse aus den TLR2 und TLR4 Hemmungsversuchen veranlassten uns, zu untersuchen, ob es auch nach einer Hemmung von p65, einer Untereinheit von NF- κ B, zu einer gesteigerten Zytokinexpression kam oder nicht.

Es wurde erneut die Expression von IL-1 β und IL-8 untersucht. IL-1 β und IL-8 stellen typische Targetgene von NF- κ B dar.

p65 Hemmung in humanen Keratinozyten

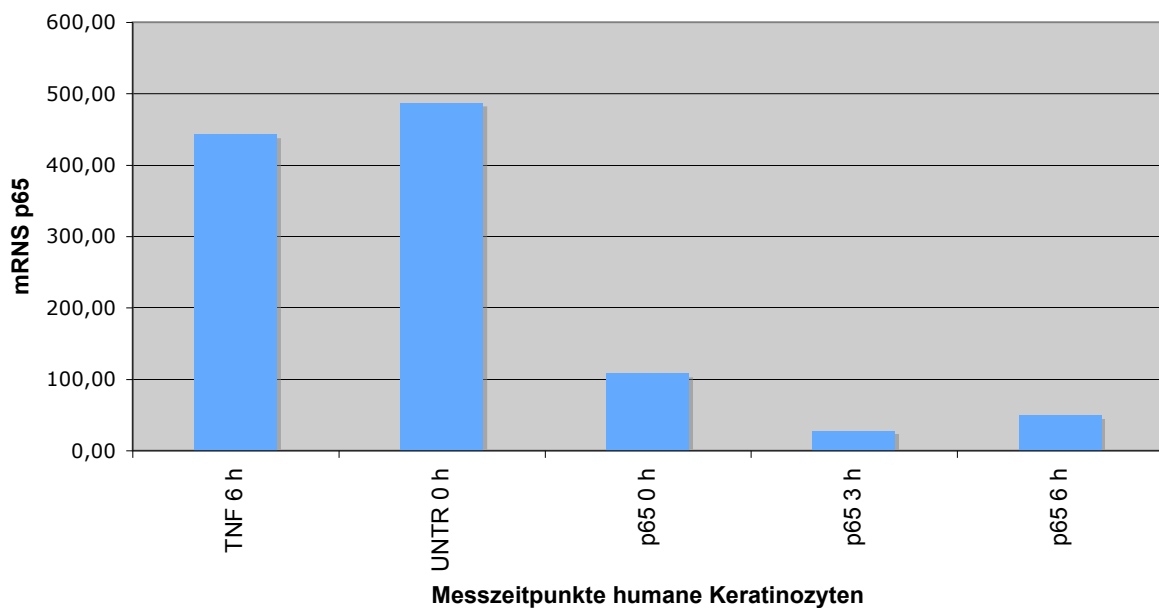


Abbildung 13

Expressionsanalyse von p65 in humanen Keratinozyten.

RNS Analyse der Expression von p65 mittels RT-PCR. Die X-Achse zeigt die verschiedenen Messzeitpunkte, die Y-Achse die relativen Einheiten. Die Ergebnisse wurden in relativen Einheiten ausgedrückt. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Im Vergleich zu den Kontrollgruppen, sah man bei den mit spezifisch gegen p65 gerichteter siRNS behandelten Keratinozyten, eine verminderte Expression von p65 (Abbil-

dung 13). Die Expression ließ von 0 h – 3 h nach, um dann wieder leicht anzusteigen. Höhepunkt der Expression scheint der 0 h Zeitpunkt.

IL-1 β Expression nach Hemmung von p65 in humanen Keratinozyten

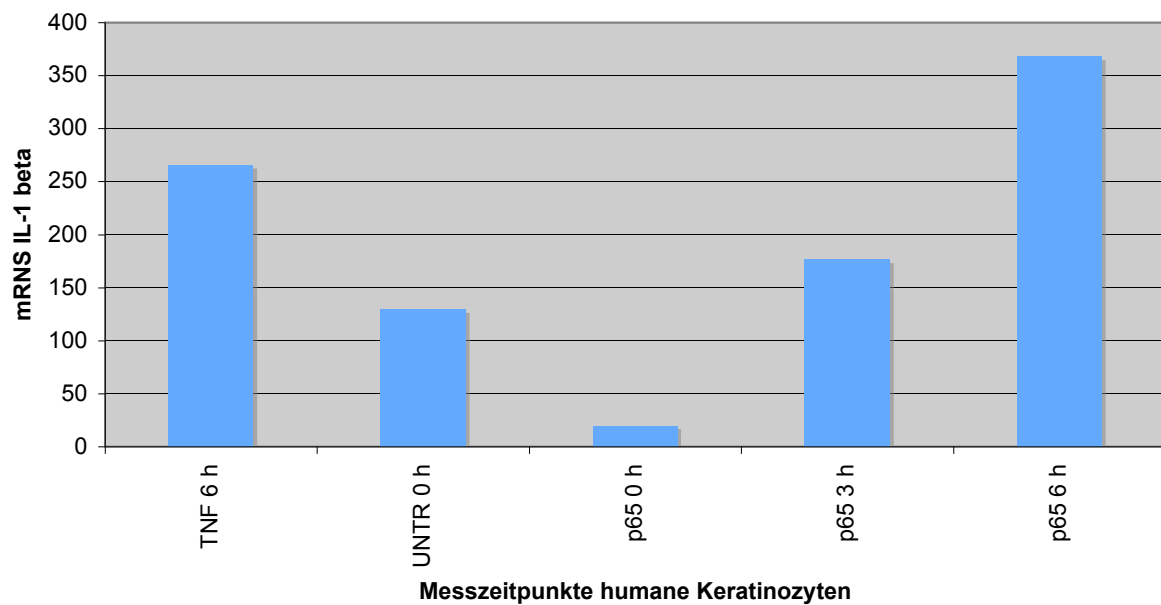
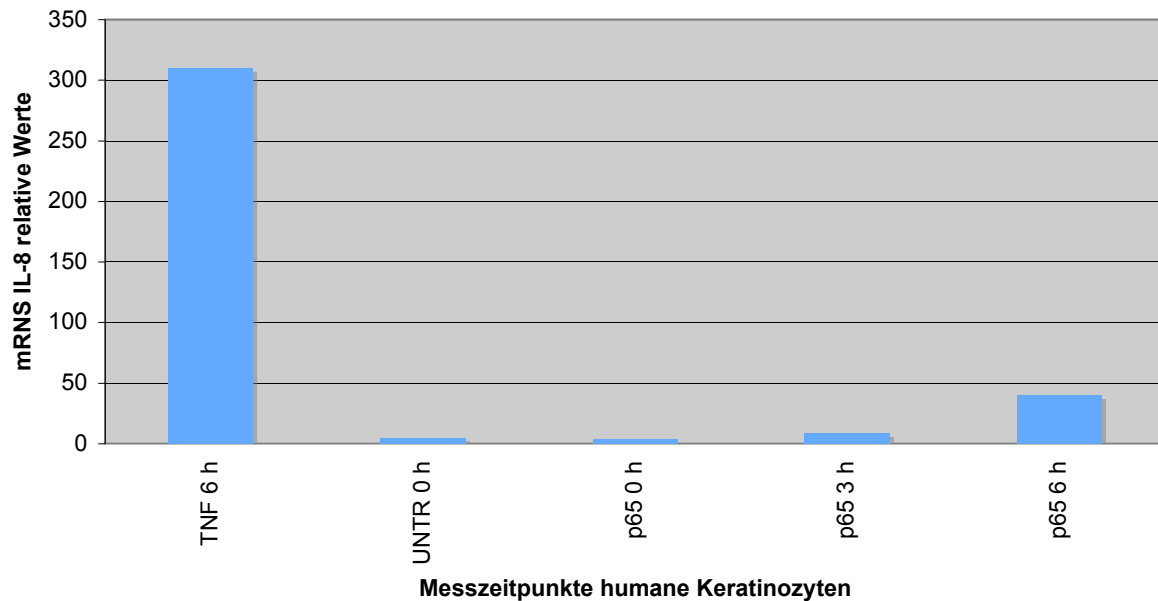


Abbildung 14

p65 abhängige Expression von IL-1 β

RNS Analyse der quantitativen Expression von IL-1 β anhand mittels RT-PCR. Die X-Achse stellt die Mess-Zeitpunkte und die Y-Achse die gemessenen relativen Einheiten dar.

In dem vorliegenden Versuch (Abbildung 14) sah man, eine linear ansteigende Expression von IL-1 β über das Niveau der unbehandelten als auch der mit TNF stimulierten Zellen hinaus.

IL-8 Expression nach Hemmung von p65 in humanen Keratinozyten**Abbildung 15****p65 abhängige Expression von IL-8**

RNS Analyse der quantitativen Expression von IL-8 anhand mittels RT-PCR. Die X-Achse stellt die Mess-Zeitpunkte und die Y-Achse die gemessenen relativen Einheiten dar.

Es kam zu einer scheinbar gesteigerten Expression von IL-8 nach 6 h in den p65 gehemmten Zellen (Abbildung 15). Der 0 h und 3 h Zeitpunkt liegt auf dem Niveau der unbehandelten Zellen. Die TNF stimulierte Probe zeigte eine sehr starke Expression von IL-8.

Zusammenfassung:

In den Experimenten mit humanen Keratinozyten kam es trotz Hemmung der NF- κ B – Untereinheit p65 zur Expression von IL-1 β und IL-8 auf mRNS Ebene.

3.3 Statistische Auswertung und benutzte Software

Die Versuche wurden in mindestens 3 von einander unabhängigen Versuchen erfolgreich durchgeführt. Mittelwerte wurden mit Hilfe des Programms Microsoft Excel Version 2007 berechnet.

4 Diskussion

C. albicans ist ein Keim, der bei den meisten Menschen Bestandteil der Normalflora ist (Odds 2010). Verschiedene Einflussfaktoren spielen eine Rolle, um aus dem harmlosen einen pathogenen Keim zu machen. Auf Wirtseite sind dies die Immunlage und verschiedene Vorerkrankungen. Auf *C. albicans* Seite die Virulenzfaktoren. Zu den Erkrankungen, die durch *C. albicans* verursacht werden können, zählen sowohl oberflächlichen Infektionen als auch Organmykosen (Zhu and Filler 2010).

Der Mensch hat verschiedene Strategien entwickelt, um eine Pilzinfektion effektiv zu bekämpfen. Im angeborenen Immunsystem nehmen die TLR eine zentrale Rolle ein. Sie erkennen PAMP (Pathogen associated microbial patterns) und leiten über intrazelluläre Signaltransduktionswege und Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B eine Immunantwort ein. Hierdurch werden verschiedene Zielgene von NF- κ B transkribiert und eine Immunantwort initiiert (Roeder, Kirschning et al. 2004; Roeder, Kirschning et al. 2004; Carmody and Chen 2007).

Grundlage der vorliegenden Arbeit waren die Erkenntnisse, dass der Toll-Rezeptor in *Drosophila* eine zentrale Rolle bei der Abwehr von Pilzinfektionen spielt (Aderem and Ulevitch 2000; Imler and Hoffmann 2000). Davon ausgehend wurde untersucht, welche Bedeutung die TLR in Säugetieren bei der Abwehr von pathogenen Pilzen haben (Netea, Ferwerda et al. 2006).

Die bisherige mykologische Forschung hat gezeigt, dass bestimmte Zellwandbestandteile von *C. albicans* von TLR erkannt werden. TLR2 erkennt besonders Mannan (Jouault, Ibata-Ombetta et al. 2003), TLR4 erkennt Phospholipomannan (Tada, Nemoto et al. 2002). Auch konnte gezeigt werden, dass die Zytokinausschüttung nach *C. albicans* Infektion durch TLR2 und TLR4 reguliert wird (Netea, Van Der Graaf et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Aspekte betrachtet: Im ersten Abschnitt wurde untersucht, welche Rolle die TLR2 und TLR4 in der Erkennung von *C. albicans* in murinen Keratinozyten auf Proteinebene spielen. Dies wurde anhand von Proteinanalysen und Kinetikversuchen überprüft. Die gewonnenen Proteine wurden mittels EMSA Analysen auf die Bindung der NF- κ B Untereinheit p65 an die DNS analysiert. Untersucht wurden sowohl Wildtyp Keratinozyten als auch Keratinozyten aus TLR2, TLR4

und TLR2/4 defizienten Mäusen. Die Aktivierung von NF- κ B wurde mittels Westernblot-Analysen dargelegt. Hier wurde die zeitabhängige Phosphorylierung von p65 beobachtet.

Im zweiten Abschnitt wurde betrachtet, ob die TLR2 und TLR4 in humanen Keratinozyten in der Erkennung von *C. albicans* auf mRNA Ebene eine Rolle spielen. Dies wurde anhand der Zytokinproduktion in TLR2 und TLR4 defizienten Keratinozyten erforscht. Es wurden Expressionsanalysen von IL-1 β und IL-8, zwei typischen NF- κ B Zytokinen, analysiert.

Aufgrund der Untersuchungsergebnisse wurde im dritten Abschnitt die Rolle der NF- κ B Untereinheit p65 in der Zytokinproduktion von humanen Keratinozyten nach Stimulation mit *C. albicans* auf mRNA Ebene betrachtet. Dies wurde mittels Zytokinproduktion in p65 defizienten humanen Keratinozyten geprüft. Es wurden wie im zweiten Abschnitt die Zytokine IL-1 β und IL-8 mittels Expressionsanalysen untersucht.

4.1 Rolle von TLR2 und TLR4 in der Erkennung von *C. albicans* in murinen Keratinozyten auf Proteinebene

Unsere Ergebnisse zeigten, dass es in allen Versuchsreihen zu einer Bindung der NF- κ B Untereinheit p65 an die murine DNS kam.

In den Wildtypkeratinozyten sah man einen scheinbaren Bindungshöhepunkt bei 4 h.

In TLR2 und TLR2/4defizienten murinen Keratinozyten kam es zu einer Bindung von NF- κ B an die DNS und es ließ sich eine Dynamik nachweisen. Es zeigte sich beim 0 h Zeitpunkt eine scheinbare Bindung mit anschließendem Rückgang der Bindung bis zum 3 h Zeitpunkt. Danach steigt die Bindungsintensität bis zum 6 h Zeitpunkt an. Im TLR2/4 Versuch zeigte sich nach einer bereits vorhandenen Bindung beim 0 h Zeitpunkt ein scheinbar zweiphasiger Verlauf mit Bindungshöhepunkten bei 2 h und 4 h. In diesen Versuchen ließ sich eine Kinetik im Sinne einer NF- κ B Aktivierung nachweisen.

In TLR4 defizienten Zellen kam es zwar auch zu einer Bindung von NF- κ B an die DNS, aufgrund der durchgehend homogenen Bindung ist hier aber eher von einer Vorstimulation als von einer Aktivierung auszugehen.

Die Aktivierung von NF- κ B, im Sinne einer Phosphorylierung der Untereinheit p65, wurde mittels Westernblot-Analysen dargelegt. Hier konnte man einen Anstieg der Phosphorylierung von p65 von 0 min nach 15 min erkennen. Danach ließ die Phosphorylierung scheinbar nach.

In allen Versuchen zeigte sich beim 0 h Zeitpunkt bereits eine Bindung, hier ist von einer Vorstimulation auszugehen.

In verschiedenen Publikationen (Akira 2006; Brikos and O'Neill 2008) wurde beschrieben, dass es durch Initiation der Signaltransduktionswege von TLR zur Aktivierung von NF- κ B kommt. Nach den vorliegenden Ergebnissen ist davon auszugehen, dass *C. albicans* in murinen Keratinozyten von TLR2 erkannt wird. Weiterhin wird die Signaltransduktionskaskade in Gang gesetzt. Für TLR4 konnte dies nicht bestätigt werden.

Roeder et. al. beschrieben bereits 2004, dass sowohl TLR2 als auch TLR4 in der Erkennung von *C. albicans* und in der Aktivierung von NF- κ B in murinen Makrophagen eine bedeutende Rolle zukommt (Roeder, Kirschning et al. 2004). Demgegenüber gibt es Veröffentlichungen, wiederum murine Makrophagen betreffend, die TLR2 die größere Bedeutung zuschreiben (Villamon, Gozalbo et al. 2004).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit müssen daher in ihrer Aussagekraft kritisch betrachtet werden: Zum einen bestand eine technische Schwierigkeit in der Gewinnung der Keratinozyten aus den Mäusen. Die Anzahl der benötigten Mäuse schwankte von Versuch zu Versuch.

Zum anderen konnte durch die Methode der Zellgewinnung nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Zellen als Keratinozyten (z. B. Fibroblasten, dendritische Zellen oder Melanozyten) in die Kultur gelangten und so das Ergebnis verfälschen konnten.

Bei der Auswertung des NF- κ B EMSA und des Westernblots kam es bei den 0 h Zeitpunkten, also den unstimulierten Proben, zur Vorstimulation. Man sah durchgehend eine Bindung der NF- κ B Untereinheit p65 an die DNS. Dies könnte auf verschiedene Aspekte zurück zu führen sein: Die Isolationsmethode könnte die Zellen einem hohen Stress aussetzen, wodurch es zur Aktivierung von NF- κ B kam. Auch die hohe Zellzahl könnte zusätzlichen Stress bedeuten und die Keratinozyten in einen apoptotischen Zustand übergehen lassen. Die enzymatische Abspaltung von Phosphatgruppen bei der NF- κ B Analyse mittels EMSA, die die Bindungsaffinität an die DNS erhöht und zu ho-

hen Hintergründen führen kann, stellt eine weitere Schwierigkeit dar. Um die unspezifischen Phosphatasen zu hemmen, wurden die Zellextrakte auf Eis gelagert, zu dem verwendeten Lysepuffer wurden Phosphataseinhibitoren hinzu gegeben. Eventuell könnte so eine zusätzliche Aktivierung durch *C. albicans* verdeckt worden sein.

Diese Arbeit zeigt, dass NF- κ B auf Proteinebene durch *C. albicans* induziert wird, dies aber scheinbar unabhängig von TLR2 und 4.

4.2 Rolle von TLR2 und TLR4 vermittelter NF- κ B Aktivierung in der Erkennung von *C. albicans* in humanen Keratinozyten auf mRNA Ebene:

Zuerst konnte gezeigt werden, dass es mittels siRNA zur Hemmung der Expression von TLR2 und TLR4 auf mRNA Ebene kam.

Im Anschluss wurde die Zytokinproduktion nach Stimulation mit *C. albicans* gemessen. Hierbei konnte man in allen Versuchsreihen einen scheinbar linearen Anstieg der Expression von IL-1 β und IL-8 erkennen. Die Zytokinproduktion schien in keinem Versuch gehemmt.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass die *C. albicans* induzierte Zytokinproduktion von IL-1 β und IL-8 in humanen Keratinozyten auf mRNA Ebene nicht alleine abhängig sind von TLR2 und TLR4.

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass TLR2 eine entscheidende Rolle in der Zytokinantwort bei Infektionen mit *C. albicans* in murinen Makrophagen spielt. Netea et al. berichteten bereits auf 2002, dass es in murinen Makrophagen nach Blockierung von TLR2 zu einer signifikant geringeren Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF und IL-1 kam. Dies konnte wiederum für TLR4 nicht bestätigt werden (Netea, Van Der Graaf et al. 2002).

Diese Ergebnisse wurden 2006 durch Gil und Gozalbo reproduziert. Sie zeigten, dass in TLR2 defizienten murinen Makrophagen, nicht jedoch in TLR4 defizienten Makrophagen, die Zytokinproduktion der Zytokine INF- γ , IL-12 und TNF α signifikant erniedrigt war (Gil and Gozalbo 2006).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die vorliegende Arbeit die früheren Publikationen bezüglich TLR4 bestätigt, ihnen aber in Bezug auf TLR2 widerspricht. Hierbei

muss man berücksichtigen, dass sich die vorliegende Arbeit auf Keratinozyten, die Literaturzitate jedoch auf Makrophagen beziehen und sich zudem die Experimente auf die mRNA Ebene beschränken.

Weiterführend könnte untersucht werden, welche anderen Rezeptorsysteme, wie Dectin-1 oder der Mannose-Rezeptor, noch an der Zytokinproduktion beteiligt sind. Frühere Untersuchungen an Makrophagen haben gezeigt, dass die TLR2 und 4 eng mit dem Dectin-1 Rezeptor sowohl an der Erkennung als auch in der Produktion von verschiedenen Zytokinen wie TNF α , IL-6, IL-10 und IL-23 zusammen arbeiten (Ferwerda, Meyer-Wentrup et al. 2008; Calugaru, Cremer et al. 2009; Reid, Gow et al. 2009). Zu überlegen wäre, ob Dectin-1 bei Defizienz der TLR alleine die Zytokinproduktion übernehmen kann.

Bisherige Forschungen über den Mannose-Rezeptor zeigten, dass er an der Erkennung von Pathogenen, deren Phagozytose und Prozession auf MHC I und II von Bedeutung ist. Ein direkter Zusammenhang mit Zytokinproduktion ist nicht beschrieben (Apostolopoulos and McKenzie 2001; Allavena, Chieppa et al. 2004).

4.3 Rolle der NF- κ B Untereinheit p65 in der Zytokinproduktion auf mRNA Ebene von humanen Keratinozyten nach Stimulation mit *C. albicans*

Aufgrund der Versuchsergebnissen aus den ersten beiden Teilen wurde im dritten Teil untersucht, welche Rolle die NF- κ B Untereinheit p65 in der Zytokinproduktion in humanen Keratinozyten nach der Stimulation mit *C. albicans* spielt.

Zuerst wurde die spezifische Hemmung von p65 in humanen Keratinozyten gezeigt. Dann wurden die Keratinozyten mit *C. albicans* stimuliert, die Proteine isoliert und untersucht. Es wurde mittels quantitativer PCR die Produktion der Zytokine IL-1 β und IL-8 in humanen Keratinozyten überprüft.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass es trotz nachgewiesener Hemmung von p65 zu einem Anstieg der Zytokine IL-1 β und IL-8 kam. Dies lässt darauf schließen, dass die Aktivierung der Gene für die Zytokine IL-1 β und IL-8 durch *C. albicans* nicht alleine von p65 abhängig ist.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt (Seite 10), liegt der Transkriptionsfaktor NF- κ B in den meisten Zellen als Heterodimer bestehend aus p65 und p50 vor (Brown, Claudio et al. 2008). Er wird durch eine Reihe von Faktoren, beispielsweise oxidativen Stress, Zytokine, physikalische Noxen, Chemikalien oder pathogene Keime, aktiviert (Messer and Rupec 2001). Als Transkriptionsfaktor ist er verantwortlich für eine Vielzahl von Genen. Dies ist sind unter anderem Gene für Chemokine, Adhäsionsmoleküle, Immunmodulatoren und Zytokine. Unter diesen Zytokinen sind auch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-8 (Bonizzi and Karin 2004).

Die Aktivierung der proinflammatorischen Zytokine geschieht hauptsächlich über den klassischen Weg. Über den alternativen Weg werden Proteine aktiviert, die für die Entwicklung lymphatischer Organen wichtig sind (Bonizzi and Karin 2004; Neumann and Naumann 2007). Somit würde man nicht erwarten, dass der Zytokinanstieg auf Aktivierung des alternativen NF- κ B Signalweg zurück zu führen ist.

Weiterführend wäre die Aktivierung von AP-1 durch TLR zu klären. Wie ebenfalls in der Einleitung erwähnt (Seite 8), kommt es über MEKK1 zur Aktivierung von AP-1. Dies führt wiederum zur Transkription von verschiedenen Genen (Brikos and O'Neill 2008). Hierzu gehören auch die Gene für verschiedene proinflammatorische Zytokine wie IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 und IL-8 (Zenz, Eferl et al. 2008; Wagner 2010).

Entsprechend der vorangestellten Diskussion ist es möglich, dass durch Hemmung von p65 und den Wegfall des klassischen NF- κ B Signalwegs die Betonung auf dem alternativen Weg und der Aktivierung von AP-1 liegt. Dementsprechend muss die Aktivierung von AP-1 in der proinflammatorischen Antwort höher bewertet werden. Folglich würde die Produktion von IL-1 β und IL-8 über die Aktivierung von AP-1 erfolgen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde angestrebt, die Erkennung von *C. albicans* in murinen und humanen Keratinozyten hinsichtlich der Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und der Toll-like Rezeptoren 2 und 4 zu klären.

Der opportunistische Keim *C. albicans* spielt in der Medizin eine zunehmende Rolle. Durch die immer größer werdenden Therapieoptionen greift der Mensch in das Immunsystem ein. Sei es durch chemotherapeutische Tumorthherapie, in der Therapie chronischer Entzündungen oder durch antiretrovirale Therapie. Gerade bei immunsupprimierten Patienten kann es durch *C. albicans* Infektionen zu schweren Organmykosen oder Septitiden kommen.

In den Experimenten wurden sowohl humane als auch murine Keratinozyten mit *C. albicans* stimuliert. Die gewonnenen Proteine und RNA wurden mittels verschiedener Methoden ausgewertet.

Die Versuche mit murinen Keratinozyten zeigten, dass es in TLR2 defizienten Keratinozyten zu einer Aktivierung von NF- κ B kam. Für TLR4 defiziente Keratinozyten konnte dies nicht gezeigt werden.

Auch die Versuche mit humanen Keratinozyten zeigten in der Zytokinproduktion trotz TLR2 und TLR4 Hemmung keine nennenswerten Unterschiede zu den Kontrollgruppen. Nach diesen Ergebnissen untersuchten wir, welche Rolle die NF- κ B Untereinheit p65 in der Zytokinproduktion der Zytokine IL-1 β und IL-8 spielt. Auch hier zeigte sich, dass es trotz Hemmung von p65 zur gesteigerten Zytokinproduktion kam.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass TLR2 und TLR4 für die Erkennung von *C. albicans* in Keratinozyten nur eine untergeordnete Rolle spielen, und dass die NF- κ B Untereinheit p65 in humanen Keratinozyten nicht alleine Einfluss auf die Produktion der Zytokine IL-1 β und IL-8 hat.

6 Abkürzungen

A – APS	Ammoniumperoxodisulfat
APZ	Antigen-Präsentierenden Zellen
B – BSA	Rinderserumalbumin
C – <i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CD	Cluster of Differentiation
CRP	C reaktives Protein
D-ddH₂O	Bidestilliertes Wasser
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E – EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
F – FCS	Fötales Kälberserum
H – h	Stunden
HRP	Horsradish Peroxid
I – INF	Interferon
IL	Interleukin
IL – 1R	Interleukin 1 Rezeptor
IKK – Komplex	I κ B-Kinase-Komplex
IRAK	Interleukin 1 associated Kinase
K – kDa	Kilo Dalton
L – LPS	Lipopolysaccharid
LTβ	Lymphotoxin β - Rezeptor
M – MAK	Membran- Angriffs-Komplex
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MEKK1	Mitogen activated Protein ki- nase/ectracellular signal-regulated ki- nase kinase
MHC	Major histocompatibility Complex

Min	Minute
MyD88	Myeloid Differentiation marker 88
N – NEMO	NF- κ B Essential Modulator
NF-κB	Nuclear Factor kappaB
NIK	NF- κ B-Inducing-Kinase
P – PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PAMP	Pathogen-associated microbial patterns
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethysulfonylfluorid
PRR	Pattern-Recognition-Receptors
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
R-RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Realtime Polymerase Kettenreaktion
PMA	Phorbol-12-Mystat-Acetat
S – SAP	Sekretorische Aspartat-Proteasen
SDS	Natriumdodecylsulfat
T – TAK1	transforming growth factor β -activated kinase
TBST	trisgepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll-like-Rezeptor(en)
TOLLIP	Toll-interacting- protein
TBST	Trisgepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRIS	Tris (hydroxymethyl)aminomethan
TRAF	Tumor necrosis factor Receptor Asso-

U – Upm

V – V

z. B.

ciated Factor

Umdrehungen pro Minute

Volt

zum Beispiel

7 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mich während der Fertigstellung meiner Dissertation sehr unterstützt haben.

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Rudolf A. Rupec für die Vergabe dieses sehr interessanten und spannenden Dissertationsthemas sowie für seine intensive Betreuung, Hilfestellung und Diskussionsbereitschaft in sowohl praktischer als auch theoretischer Hinsicht bedanken.

Während meiner zweieinhalb jähriger Laborarbeit fand ich immer Unterstützung bei meinem Laborteam Birgit Eckelt und Dr. Bernd Rebholz, die beide leider verstorben sind.

Bedanken möchte ich mich auch bei PD Dr. Robert Besch und Claudia Kammerbauer, die mir immer geholfen haben.

Auch dem Candida-Labor schulde ich Dank für die viele Hilfe.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester, meinen Freunden und meinem Freund. Danke für eure Unterstützung und Geduld.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Schmidt-Habel, Anne-Marie
Geburtsdatum	13.09.1979
Geburtsort	Düsseldorf
Familienstand	Ledig

Schul Ausbildung

1985 – 1989	Erich-Kästner-Grundschule, Langenfeld (NRW)
1989 – 1999	Konrad-Adenauer-Gymnasium, Langenfeld (NRW)

Berufsausbildung

2000 – 2003	Krankenpflegeausbildung, Krankenpflegeschule der Schwester-Blandine-Ridder-Schule, Köln
2003	Krankenpflegeexamen zur staatlich examinierten Krankenschwester

Hochschulstudium

2003 – 2005	Vorklinischer Abschnitt, Ludwig-Maximilians-Universität München
2005	Physikum
2005 – 2008	Klinischer Abschnitt, Ludwig-Maximilians-Universität München
2009	Staatsexamen

Famulaturen

2005	Dermatologie, Dermatologische Universitätsklinik, München (Prof. Plewig)
2005	Allgemeinmedizin, Langenfeld (Dr. Schmidt-Habel)
2007	Anästhesie, Mater Misericordiae University Hospital, Dublin, Irland (Prof. Frizelle)

2007 Dermatologie, St. Vincent's Hospital, Melbourne, Australien (Prof. Sinclair)

Praktisches Jahr

2008 Dermatologie, Klinik für Dermatologie, Augsburg (Prof. Welzel)

2008 – 2009 Innere Medizin, Medizinische Klinik Innenstadt, München (Prof. Reincke)

2009 Chirurgie, Chirurgische Klinik Innenstadt, München (Prof. Mutschler)

Beruflicher Werdegang

Seit 03/2010 Assistenzärztin Hautklinik, Universitätsklinikum Erlangen

Dissertation

2005 – 2013 Erkennung von C. albicans in Keratinozyten: Vergleich muriner und humaner Keratinozyten hinsichtlich der Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF-κB und Toll-like-Rezeptoren 2 und 4 Prof. Rupec, Dermatologische Universitätsklinik München

Sprachkenntnisse

Englisch sicher in Wort und Schrift

Spanisch Grundkenntnisse

Literaturverzeichnis

- Adachi, Y. and N. Ohno (2006). "[Contribution of dectin-1 to the recognition of fungal cell wall products and the activation of innate immune response]." *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **47**(3): 185-94.
- Aderem, A. and R. J. Ulevitch (2000). "Toll-like receptors in the induction of the innate immune response." *Nature* **406**(6797): 782-7.
- Akira, S. (2006). "TLR signaling." *Curr Top Microbiol Immunol* **311**: 1-16.
- Alam, R. (1998). "A brief review of the immune system." *Prim Care* **25**(4): 727-38.
- Alberts, B., A. Johnson, et al. (2003). "Molekularbiologie der Zelle." Wiley-VCH **4.Auflage**.
- Allavena, P., M. Chieppa, et al. (2004). "From pattern recognition receptor to regulator of homeostasis: the double-faced macrophage mannose receptor." *Crit Rev Immunol* **24**(3): 179-92.
- Andersen, M. H., D. Schrama, et al. (2006). "Cytotoxic T cells." *J Invest Dermatol* **126**(1): 32-41.
- Apostolopoulos, V. and I. F. McKenzie (2001). "Role of the mannose receptor in the immune response." *Curr Mol Med* **1**(4): 469-74.
- Bakkar, N. and D. C. Guttridge (2010). "NF-kappaB signaling: a tale of two pathways in skeletal myogenesis." *Physiol Rev* **90**(2): 495-511.
- Bauer, S., T. Muller, et al. (2009). "Pattern recognition by Toll-like receptors." *Adv Exp Med Biol* **653**: 15-34.
- Blanco, J. L. and M. E. Garcia (2008). "Immune response to fungal infections." *Vet Immunol Immunopathol* **125**(1-2): 47-70.
- Bonilla, F. A. and H. C. Oettgen (2010). "Adaptive immunity." *J Allergy Clin Immunol* **125**(2 Suppl 2): S33-40.
- Bonizzi, G. and M. Karin (2004). "The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity." *Trends Immunol* **25**(6): 280-8.
- Brikos, C. and L. A. O'Neill (2008). "Signalling of toll-like receptors." *Handb Exp Pharmacol*(183): 21-50.
- Brown, G. D., J. Herre, et al. (2003). "Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans." *J Exp Med* **197**(9): 1119-24.
- Brown, K. D., E. Claudio, et al. (2008). "The roles of the classical and alternative nuclear factor-kappaB pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis." *Arthritis Res Ther* **10**(4): 212.
- Calderone, R., S. Suzuki, et al. (2000). "Candida albicans: adherence, signaling and virulence." *Med Mycol* **38 Suppl 1**: 125-37.
- Calderone, R. A. (1993). "Recognition between Candida albicans and host cells." *Trends Microbiol* **1**(2): 55-8.
- Calderone, R. A. and W. A. Fonzi (2001). "Virulence factors of Candida albicans." *Trends Microbiol* **9**(7): 327-35.
- Calugaru, A., L. Cremer, et al. (2009). "Recognition and modulation of Dectin-1 and TLR-2 receptors by curdlan derivatives and purified natural extracts." *Roum Arch Microbiol Immunol* **68**(3): 119-24.
- Carmody, R. J. and Y. H. Chen (2007). "Nuclear factor-kappaB: activation and regulation during toll-like receptor signaling." *Cell Mol Immunol* **4**(1): 31-41.
- Carroll, M. C. (2008). "Complement and humoral immunity." *Vaccine* **26 Suppl 8**: I28-33.
- Chaffin, W. L. (2008). "Candida albicans cell wall proteins." *Microbiol Mol Biol Rev* **72**(3): 495-544.
- Darai, G., M. Handermann, et al. (2009). "Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen." Springer Berlin Heidelberg.

- Dejardin, E. (2006). "The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development." *Biochem Pharmacol* **72**(9): 1161-79.
- Dennehy, K. M. and G. D. Brown (2007). "The role of the beta-glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection." *J Leukoc Biol* **82**(2): 253-8.
- Dobozy, A., G. Szolnoky, et al. (1996). "Mannose receptors are implicated in the *Candida albicans* killing activity of epidermal cells." *Acta Microbiol Immunol Hung* **43**(1): 93-5.
- Dudley, D. J. (1992). "The immune system in health and disease." *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* **6**(3): 393-416.
- Ferwerda, G., F. Meyer-Wentrup, et al. (2008). "Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages." *Cell Microbiol* **10**(10): 2058-66.
- Flannagan, R. S., G. Cosio, et al. (2009). "Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies." *Nat Rev Microbiol* **7**(5): 355-66.
- Fridkin, S. K. and W. R. Jarvis (1996). "Epidemiology of nosocomial fungal infections." *Clin Microbiol Rev* **9**(4): 499-511.
- Fritsch, P. (2009). "Dermatologie und Venerologie für das Studium." *Springer Verlag*: 180-195.
- Gantner, B. N., R. M. Simmons, et al. (2003). "Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2." *J Exp Med* **197**(9): 1107-17.
- Garber, G. (2001). "An overview of fungal infections." *Drugs* **61 Suppl 1**: 1-12.
- Ghosh, S. and M. S. Hayden (2008). "New regulators of NF-kappaB in inflammation." *Nat Rev Immunol* **8**(11): 837-48.
- Gil, M. L. and D. Gozalbo (2006). "TLR2, but not TLR4, triggers cytokine production by murine cells in response to *Candida albicans* yeasts and hyphae." *Microbes Infect* **8**(8): 2299-304.
- Gil, M. L. and D. Gozalbo (2009). "Role of Toll-like receptors in systemic *Candida albicans* infections." *Front Biosci* **14**: 570-82.
- Goodridge, H. S., A. J. Wolf, et al. (2009). "Beta-glucan recognition by the innate immune system." *Immunol Rev* **230**(1): 38-50.
- Guani-Guerra, E., T. Santos-Mendoza, et al. (2010). "Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease." *Clin Immunol* **135**(1): 1-11.
- Hallman, M., M. Ramet, et al. (2001). "Toll-like receptors as sensors of pathogens." *Pediatr Res* **50**(3): 315-21.
- Herre, J., J. A. Willment, et al. (2004). "The role of Dectin-1 in antifungal immunity." *Crit Rev Immunol* **24**(3): 193-203.
- Hertz-Fowler, C. and A. Pain (2009). "Unity in diversity: lessons from *Candida*." *Nat Rev Microbiol* **7**(11): 763.
- Hetru, C. and J. A. Hoffmann (2009). "NF-kappaB in the immune response of *Drosophila*." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**(6): a000232.
- Homann, O. R., J. Dea, et al. (2009). "A phenotypic profile of the *Candida albicans* regulatory network." *PLoS Genet* **5**(12): e1000783.
- Imler, J. L. and J. A. Hoffmann (2000). "Toll and Toll-like proteins: an ancient family of receptors signaling infection." *Rev Immunogenet* **2**(3): 294-304.
- Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses." *Nat Immunol* **5**(10): 987-95.
- Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." *Annu Rev Immunol* **20**: 197-216.
- Jiang, H. and L. Chess (2009). "How the immune system achieves self-nonself discrimination during adaptive immunity." *Adv Immunol* **102**: 95-133.
- Jouault, T., S. Ibata-Ombetta, et al. (2003). "*Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors." *J Infect Dis* **188**(1): 165-72.

- Kabir, M. A. and M. A. Hussain (2009). "Human fungal pathogen *Candida albicans* in the postgenomic era: an overview." *Expert Rev Anti Infect Ther* **7**(1): 121-34.
- Kaminishi, H., H. Miyaguchi, et al. (1995). "Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase." *Infect Immun* **63**(3): 984-8.
- Kawai, T. and S. Akira (2007). "TLR signaling." *Semin Immunol* **19**(1): 24-32.
- Kawai, T. and S. Akira (2009). "The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition." *Int Immunol* **21**(4): 317-37.
- Kimberg, M. and G. D. Brown (2008). "Dectin-1 and its role in antifungal immunity." *Med Mycol* **46**(7): 631-6.
- Kirschning, C. J. and S. Bauer (2001). "Toll-like receptors: cellular signal transducers for exogenous molecular patterns causing immune responses." *Int J Med Microbiol* **291**(4): 251-60.
- Kojic, E. M. and R. O. Darouiche (2004). "Candida infections of medical devices." *Clin Microbiol Rev* **17**(2): 255-67.
- Koster, M. I. (2009). "Making an epidermis." *Ann N Y Acad Sci* **1170**: 7-10.
- Kumar, H., T. Kawai, et al. (2009). "Toll-like receptors and innate immunity." *Biochem Biophys Res Commun* **388**(4): 621-5.
- Leulier, F. and B. Lemaitre (2008). "Toll-like receptors--taking an evolutionary approach." *Nat Rev Genet* **9**(3): 165-78.
- Liou, H. C. (2002). "Regulation of the immune system by NF-kappaB and IkappaB." *J Biochem Mol Biol* **35**(6): 537-46.
- Liou, H. C. (2006). "NF-kappaB/Rel Transkription Factor Family." Springer Verlag.
- McGettrick, A. F. and L. A. O'Neill (2010). "Regulators of TLR4 signaling by endotoxins." *Subcell Biochem* **53**: 153-71.
- McKenzie, E. J., P. R. Taylor, et al. (2007). "Mannose receptor expression and function define a new population of murine dendritic cells." *J Immunol* **178**(8): 4975-83.
- Messer, G. and R. A. Rupec (2001). "[Nuclear factor kappa B (NF-kappa B). I. Function and regulation]." *Hautarzt* **52**(7): 677-85.
- Miller, L. S. (2008). "Toll-like receptors in skin." *Adv Dermatol* **24**: 71-87.
- Moll, I. (2005). "Dermatologie." Thieme Verlag **6. Auflage**: 592.
- Monod, M. and Z. M. Borg-von (2002). "Secreted aspartic proteases as virulence factors of *Candida* species." *Biol Chem* **383**(7-8): 1087-93.
- Morgan, B. P., K. J. Marchbank, et al. (2005). "Complement: central to innate immunity and bridging to adaptive responses." *Immunol Lett* **97**(2): 171-9.
- Muzio, M., N. Polentarutti, et al. (2000). "Toll-like receptors: a growing family of immune receptors that are differentially expressed and regulated by different leukocytes." *J Leukoc Biol* **67**(4): 450-6.
- Naglik, J., A. Albrecht, et al. (2004). "*Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions." *Cell Microbiol* **6**(10): 915-26.
- Naglik, J. R., S. J. Challacombe, et al. (2003). "*Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis." *Microbiol Mol Biol Rev* **67**(3): 400-28, table of contents.
- Netea, M. G., G. Ferwerda, et al. (2006). "Recognition of fungal pathogens by toll-like receptors." *Curr Pharm Des* **12**(32): 4195-201.
- Netea, M. G., C. Van der Graaf, et al. (2004). "Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **23**(9): 672-6.
- Netea, M. G., C. A. Van Der Graaf, et al. (2002). "The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis." *J Infect Dis* **185**(10): 1483-9.
- Neumann, J. (2008). "Immunbiologie Eine Einführung." Springer Berlin Heidelberg.
- Neumann, M. and M. Naumann (2007). "Beyond IkappaBs: alternative regulation of NF-kappaB activity." *FASEB J* **21**(11): 2642-54.

- Nielsen, K. and J. Heitman (2007). "Sex and virulence of human pathogenic fungi." Adv Genet **57**: 143-73.
- Niyonsaba, F., I. Nagaoka, et al. (2006). "Human defensins and cathelicidins in the skin: beyond direct antimicrobial properties." Crit Rev Immunol **26**(6): 545-76.
- O'Dea, E. and A. Hoffmann (2009). "NF-kappaB signaling." Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med **1**(1): 107.
- O'Neill, L. A. and A. G. Bowie (2007). "The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **7**(5): 353-64.
- O'Neill, L. A., A. Dunne, et al. (2003). "Mal and MyD88: adapter proteins involved in signal transduction by Toll-like receptors." J Endotoxin Res **9**(1): 55-9.
- Odds, F. C. (2010). "Molecular phylogenetics and epidemiology of *Candida albicans*." Future Microbiol **5**: 67-79.
- Pahl, H. L. (1999). "Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors." Oncogene **18**(49): 6853-66.
- Pfaller, M. A. and D. J. Diekema (2007). "Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem." Clin Microbiol Rev **20**(1): 133-63.
- Rebholz, B., K. Kehe, et al. (2008). "Role of NF-kappaB/RelA and MAPK pathways in keratinocytes in response to sulfur mustard." J Invest Dermatol **128**(7): 1626-32.
- Reid, D. M., N. A. Gow, et al. (2009). "Pattern recognition: recent insights from Dectin-1." Curr Opin Immunol **21**(1): 30-7.
- Roeder, A., C. J. Kirschning, et al. (2004). "Toll-like receptors and innate antifungal responses." Trends Microbiol **12**(1): 44-9.
- Roeder, A., C. J. Kirschning, et al. (2004). "Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity." Med Mycol **42**(6): 485-98.
- Ruchel, R., B. Boning-Stutzer, et al. (1988). "A synoptical approach to the diagnosis of candidosis, relying on serological antigen and antibody tests, on culture, and on evaluation of clinical data." Mycoses **31**(2): 87-106.
- Ruhnke, M. (2006). "Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida albicans* yeasts." Curr Drug Targets **7**(4): 495-504.
- Rus, H., C. Cudrici, et al. (2005). "The role of the complement system in innate immunity." Immunol Res **33**(2): 103-12.
- Sato, M., H. Sano, et al. (2003). "Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A." J Immunol **171**(1): 417-25.
- Schaller, M., C. Borelli, et al. (2005). "Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*." Mycoses **48**(6): 365-77.
- Schneider, J. J., A. Unholzer, et al. (2005). "Human defensins." J Mol Med **83**(8): 587-95.
- Schorey, J. S. and C. Lawrence (2008). "The pattern recognition receptor Dectin-1: from fungi to mycobacteria." Curr Drug Targets **9**(2): 123-9.
- Sen, R. and D. Baltimore (1986). "Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism." Cell **47**(6): 921-8.
- Sethi, G., B. Sung, et al. (2008). "Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside." Exp Biol Med (Maywood) **233**(1): 21-31.
- Szolnoky, G., Z. Bata-Csorgo, et al. (2001). "A mannose-binding receptor is expressed on human keratinocytes and mediates killing of *Candida albicans*." J Invest Dermatol **117**(2): 205-13.
- Tada, H., E. Nemoto, et al. (2002). "Saccharomyces cerevisiae- and *Candida albicans*-derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner." Microbiol Immunol **46**(7): 503-12.
- Taylor, P. R., S. Gordon, et al. (2005). "The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition." Trends Immunol **26**(2): 104-10.

- Tsoni, S. V. and G. D. Brown (2008). "beta-Glucans and dectin-1." Ann N Y Acad Sci **1143**: 45-60.
- Ulfig, N. (2005). "Kurzlehrbuch Histologie." Thieme.
- Villamon, E., D. Gozalbo, et al. (2004). "Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections." Microbes Infect **6**(1): 1-7.
- Wagner, E. F. (2010). "Bone development and inflammatory disease is regulated by AP-1 (Fos/Jun)." Ann Rheum Dis **69 Suppl 1**: i86-88.
- Willment, J. A. and G. D. Brown (2008). "C-type lectin receptors in antifungal immunity." Trends Microbiol **16**(1): 27-32.
- Wong, E. T. and V. Tergaonkar (2009). "Roles of NF-kappaB in health and disease: mechanisms and therapeutic potential." Clin Sci (Lond) **116**(6): 451-65.
- Zenz, R., R. Eferl, et al. (2008). "Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease." Arthritis Res Ther **10**(1): 201.
- Zhu, W. and S. G. Filler (2010). "Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells." Cell Microbiol **12**(3): 273-82.